

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO

“DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ”

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA



DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 MEDIANTE LA TÉCNICA DE SPIRAL ARRAYS EN CARCINOMAS PAPILARES DE TIROIDES CON LA MUTACIÓN V600E DEL GEN BRAF

PRESENTA

DRA. JUANA ELIZABETH TADEO GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA**

MONTERREY, N.L., MEXICO

FEBRERO 2019

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO

“DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ”

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA



DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 MEDIANTE LA TÉCNICA DE SPIRAL ARRAYS EN CARCINOMAS PAPILARES DE TIROIDES CON LA MUTACIÓN V600E DEL GEN BRAF

PRESENTA

DRA. JUANA ELIZABETH TADEO GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
ANATOMIA PATOLOGIA Y CITOPATOLOGIA**

DIRECTOR: DR. MED. LUIS ANGEL CECENAS FALCON

CO DIRECTOR: DRA. MED. GABRIELA SOFIA GOMEZ MACIAS

MONTERREY, N.L., MEXICO

FEBRERO 2019

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN



DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 MEDIANTE LA TÉCNICA DE SPIRAL ARRAYS EN CARCINOMAS PAPILARES DE TIROIDES CON LA MUTACIÓN V600E DEL GEN BRAF

TESIS

DRA. JUANA ELIZABETH TADEO GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
ANATOMIA PATOLOGIA Y CITOPATOLOGIA**

FEBRERO 201

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

**HOSPITAL UNIVERSITARIO
"DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ"
SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA**



**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 MEDIANTE LA TÉCNICA DE
SPIRAL ARRAYS EN CARCINOMAS PAPILARES DE TIROIDES CON LA
MUTACIÓN V600E DEL GEN BRAF**

Aprobación de Tesis

**Dr. Med. Luis Ángel Ceceñas Falcón
Director de Tesis**

**Dra. Med. Gabriela Sofía Gómez Macías
Codirector de tesis**

**Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de enseñanza**

**Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe del Servicio**

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 MEDIANTE LA
TÉCNICA DE SPIRAL ARRAYS EN CARCINOMAS PAPILARES DE
TIROIDES CON LA MUTACIÓN V600E DEL GEN BRAF**

PRESENTADO POR:

DRA. JUANA ELIZABETH TADEO GONZALEZ

Este trabajo se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" bajo la dirección del Dr. Med. Luis Ángel Ceceñas Falcón y la codirección de la Dra. Med. Gabriela Sofía Gómez Macías.



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana

Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

Febrero 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a su hijo Jesús por permitirme llegar a este día de mi vida, por darme salud a mí y a mi familia, por su infinita bondad y amor por ser mi apoyo, mi camino y luz.

Por blindar mi corazón contra las pruebas, fortalecerlo, por consolarme y amarme en todos los momentos de debilidad. Por la dicha de haberme puesto en este mundo de la medicina y sobre todo en esta hermosa especialidad llamada -anatomía patológica, por muy duro que fueron algunos días, valió la pena cada uno de los momentos vividos en estos cuatro años.

A mis padres Marina y José, por darme la vida, por su amor, por los valores y principios que me inculcaron y que me forjaron como el ser humano que soy. Son mi ejemplo de fortaleza y perseverancia.

A mis hermanos Milagros, Valeria y José por su amor y por siempre estar para mí en la distancia.

A ellos, mi familia por su generosidad, este es un logro de todos, gracias por todos los sacrificios que han hecho y que han significado esta carrera, desde económicos hasta sentimentales. Sin ellos no lo habría logrado, son el principal motor de mi vida.

A mi tía Socorro† por siempre creer en mí, sé que en el cielo se siente muy orgullosa y festeja este logro junto *a mi abuelo Miguel†*. Siempre viven en mi corazón.

A mi tía Mariana por su amor y por hacerme sentir, aún en la distancia apoyada en todos los sentidos.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Hospital Universitario –Dr. José Eleuterio González‡ pilares en mi formación como médico y especialista.

Al Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón por siempre escucharme y darme su consejo, por hacerme sentir que siempre conté con su apoyo incondicional en todo momento y de todas maneras posibles. Nuevamente le doy gracias a Dios por ponernos juntos en esta travesía llamada tesis, a pesar de las dificultades siempre se mantuvo firme. Por ser mi maestro y modelo a seguir como patólogo, por el gran ser humano que es, por su nobleza. Por la manera tan generosa en la que siempre estuvo presente en la dirección de este proyecto.

Al Dr. Álvaro Barbosa Quintana, por el gran maestro y extraordinario ser humano que es, por todos los consejos que me brindo en cualquier momento, de corazón, con amor y sin esperar nada a cambio. Por hacerme sentir bienvenida y querida. Gracias por la huella que deja en todos y cada uno de sus residentes, incluyéndome. Doy gracias a Dios por hacerme coincidir con él en mi formación como especialista.

A la Dra. Oralia Barboza Quintana por abrirme las puertas de este Servicio para realizar mi residencia y por su apoyo, así como a todos mis demás profesores, quienes compartieron conmigo su experiencia.

A Rosa Nelly Villa Esquivel por su amor y apoyo incondicional durante mi residencia y por formar parte de manera desinteresada en la parte técnica de este proyecto.

A mis padres Marina y José
A mis hermanos Milagros, Valeria y José
A mi tía Socorro †

Por todo el amor que me brindan, principal alimento de la vida.

INDICE

INTRODUCCION **1-9**

Generalidades

Morfología del carcinoma papilar de tiroides

Sub variantes histológicas del carcinoma papilar

Patología molecular

- BRAF V600E
- Vía PD1/PD-L1
- PD-L1

MARCO TEORICO **10-15**

Técnica de Spiral Array

Heterogeneidad intratumoral de PD-L1

JUSTIFICACION **16**

HIPOTESIS **17**

OBJETIVOS **18**

Objetivo general

Objetivos secundarios

MATERIAL Y METODOS	19-25
Diseño de la metodología del estudio	
Características de la población	
Descripción de la metodología del estudio	
Análisis estadístico	
 RESULTADOS	 26-47
Datos generales	
Características histopatológicas	
Expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1	
Spiral Arrays Patrones de	
tinción Intensidad de	
positividad Proporción de	
positividad	
Expresión de PD-L1 en relación al tamaño y extensión tumoral	
 DISCUSION	 48-50
 CONCLUSION	 51
 RESUMEN	 52-54
 REFERENCIAS	 55-56

INTRODUCCIÓN

El cáncer de tiroides representa aproximadamente el 1% a 1.5%, de todos los tumores malignos diagnosticados en los Estados Unidos, y su incidencia ha aumentado continuamente en las últimas tres décadas en todo el mundo, esta tendencia está presente en todos los continentes, excepto en África, donde la detección es posiblemente insuficiente. Los tumores malignos de tiroides representan la neoplasia maligna más común del sistema endocrino, lo que supone un importante reto diagnóstico para los patólogos. En general, el cáncer de tiroides afecta a jóvenes y adultos de mediana edad. Las mujeres son afectadas por lesiones tiroideas cuatro veces más que los hombres (1).

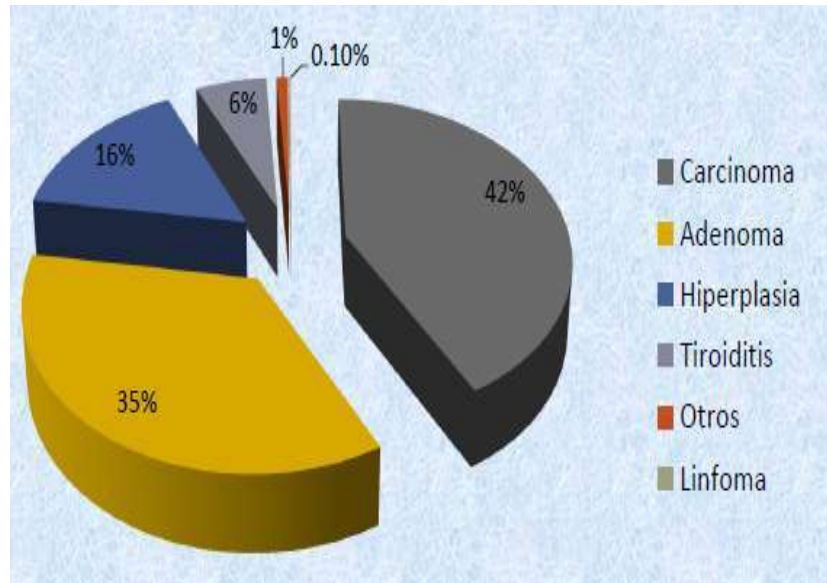
En cuanto a su clasificación histológica el carcinoma papilar consiste en 85-90% de todos los casos de cáncer de tiroides, seguido de carcinoma folicular (5-10%) y carcinoma medular (alrededor del 2%), carcinoma anaplásico representa menos del 2% de los cánceres de tiroides y suele aparecer en los pacientes de edad avanzada (2).

En un estudio previamente realizado en el año 2018 del Hospital Universitario –Dr. José Eleuterio González - y titulado *PATOLOGIA QUIRURGICA DE LA GLANDULA TIROIDES EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO «DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ», UANL.REVISION DE 20 AÑOS*. Se observó la siguiente frecuencia de patología tiroidea en la población Mexicana.

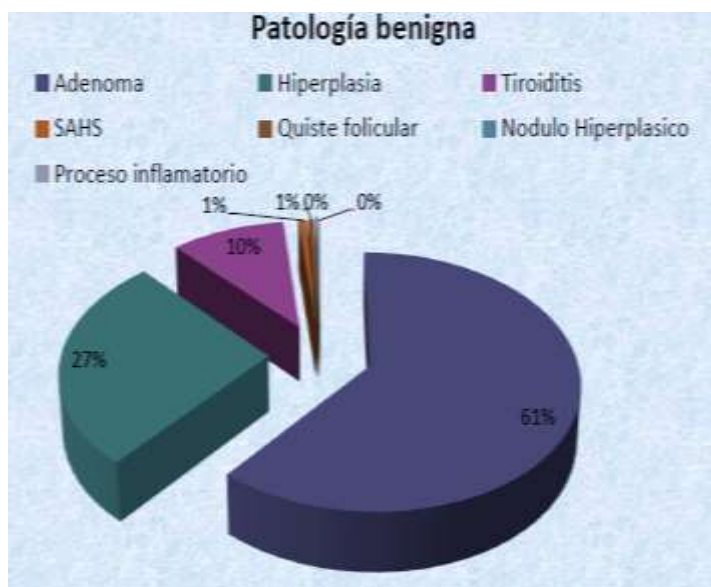
En 20 años se recibieron 224,252 especímenes quirúrgicos de los cuales, 848 (0.37%) correspondieron a casos de patología de la glándula tiroides:

- Especímenes con más de una patología: 101
- En cuanto a los diagnósticos, 549 resultaron patologías benignas (57,8%) y 400 patologías malignas (42,2 %). la patología benigna más frecuente fue el adenoma con 35.30% y la patología maligna más frecuente fue el carcinoma papilar con 38,14% la edad de presentación promedio fue de 45.8 años para la patología benigna y de 45.3 años para la patología maligna y la *relación mujer/hombre fue de 10:1 para la benigna y 4.3:1 para la patología maligna*.
- Los casos de adenoma correspondieron a 335 que representan el 61.02% de la patología benigna
- Carcinoma correspondió a 399 casos que representa el 99.75% de la patología maligna⁽¹⁹⁾

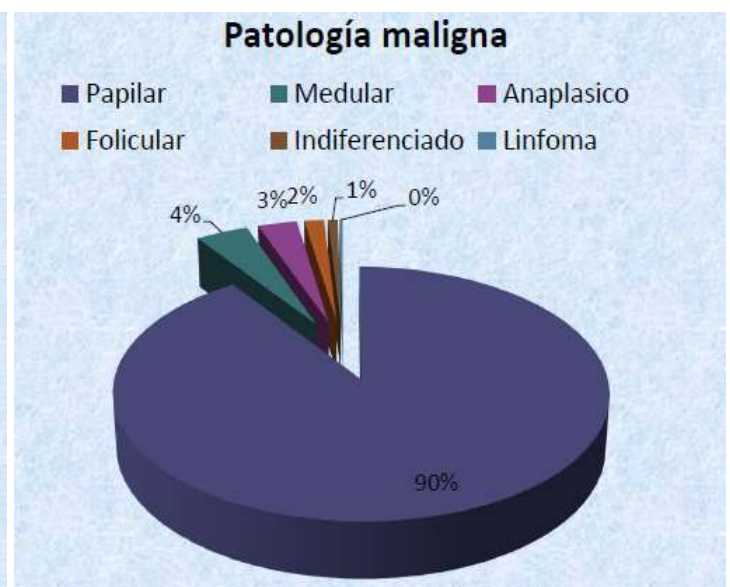
Grafica de la patología quirúrgica de la glándula tiroides



Grafica de la distribución de la patología benigna



Grafica de la distribución de la patología maligna



Morfología

El carcinoma papilar de tiroides, microscópicamente presenta características neoplásicas que se han convertido en un sello en su diagnóstico las cuales incluyen: núcleos huecos (núcleos de Anita la huerfanita), los cuales son ovalados y más grandes que los núcleos foliculares normales con una cromatina clara; también se observan ranuras nucleares, inclusiones citoplasmáticas y superposición nuclear ⁽³⁾ (Figura 1).

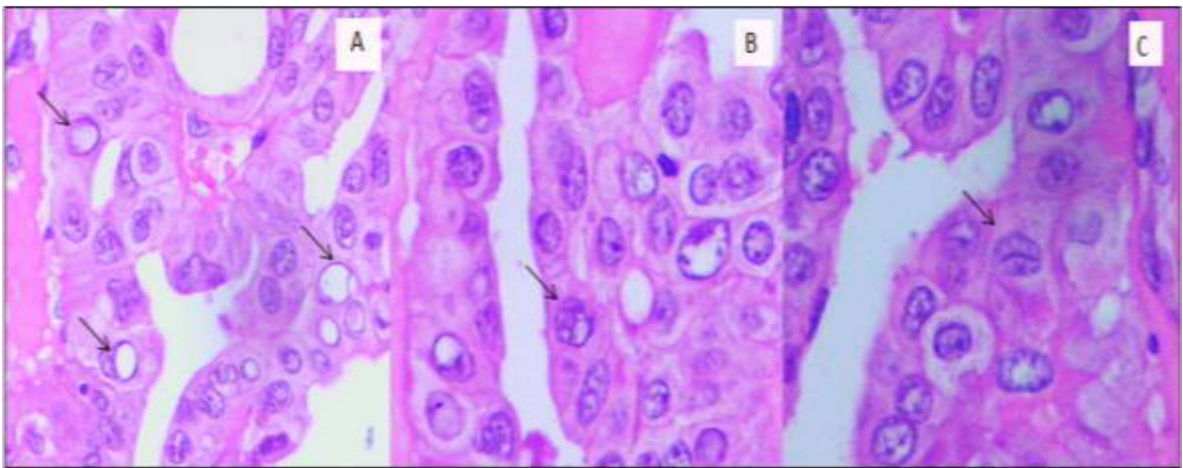


Figura 1. Características nucleares del carcinoma papilar de tiroides. A) Núcleos en Anita la huerfanita (Flechas) B) pseudoinclusiones (Flecha), C) Ranuras (Flecha).

Variantes histológicas

Este carcinoma tiene variantes morfológicas, con importancia pronóstica.

Estas variantes se describen a continuación:

Variante folicular: Es el subtipo más común del carcinoma papilar de tiroides, ya que constituye entre el 9% y el 22,5% de todos los casos. Microscópicamente, tiene predominantemente una arquitectura folicular, que está revestida por células con características nucleares de carcinoma papilar (Figura 2) ⁽⁴⁾. La mutación de BRAF se ha reportado hasta en el 7% de los tumores que presentan esta variedad, sin embargo se conoce que es mas frecuente que presente mutaciones en RAS (25%) ⁽⁵⁾

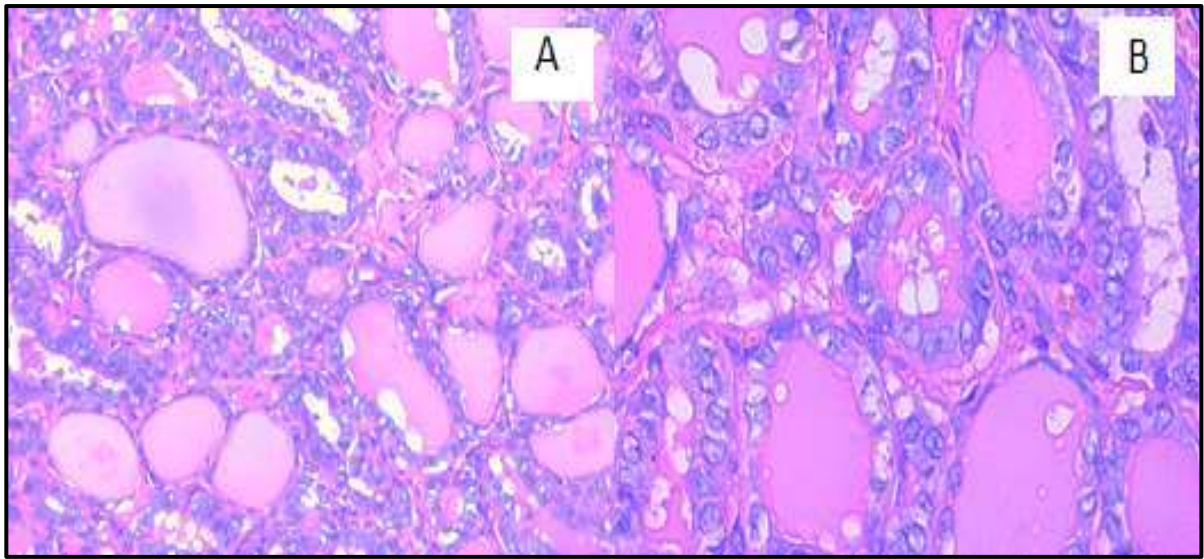


Figura 2. Carcinoma Papilar de Tiroides variedad Folicular. A) HyE 10X donde se observa una arquitectura folicular. B) HyE 40X en este acercamiento se observan las características típicas del carcinoma papilar.

Variante esclerosante difusa: Variante rara, que se observa en pacientes jóvenes con una mayor incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos cervicales. Tiene un pronóstico desfavorable. Histológicamente se caracteriza por fibrosis densa, metaplasia escamosa, infiltración linfoide con centros germinales y cuerpos de psamoma. No se ha asociado a mutaciones en BRAF, más si a mutaciones en RET/PTC. (6,7)

Variante de células altas: Descrito por primera vez en 1976 y definido como un carcinoma papilar con células al menos dos veces más altas que el ancho, con núcleos orientados a la membrana basal y citoplasma eosinofílico (Figura 3), estos hallazgos se deben encontrar por lo menos entre el 30 y 50% del tumor. Con frecuencia tiene invasión vascular, extensión extratiroidea, metástasis a ganglios linfáticos y metástasis a distancia. Son un factor de mal pronóstico, se cree que este comportamiento agresivo está relacionado a una mayor prevalencia de mutaciones en BRAF en comparación con la variante clásica (6,8).

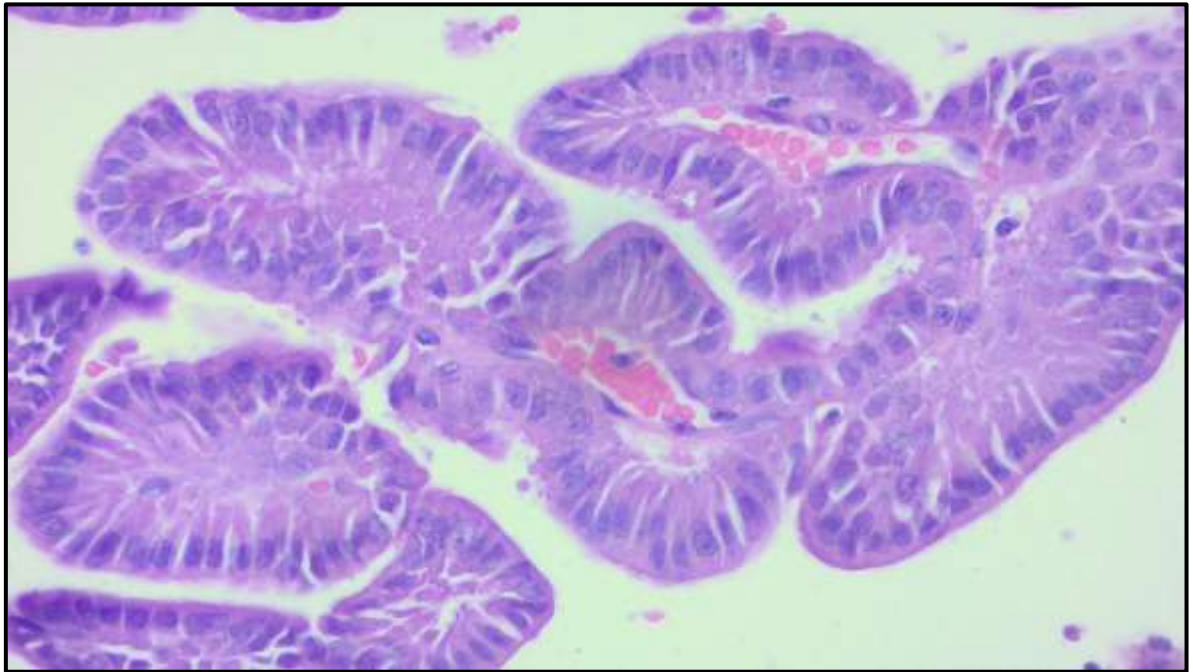


Figura 3. Carcinoma papilar de Tiroides Variedad células altas.

Variante Sólida: Para poder clasificar esta variante, el tumor debe tener entre el 50 al 70% de patrón sólido (Figura 4). Es más común en niños y con historia de exposición a la radiación, y se ha asociado a una frecuencia mayor de metástasis a distancia y un peor pronóstico en comparación con el carcinoma papilar clásico. (6,9).

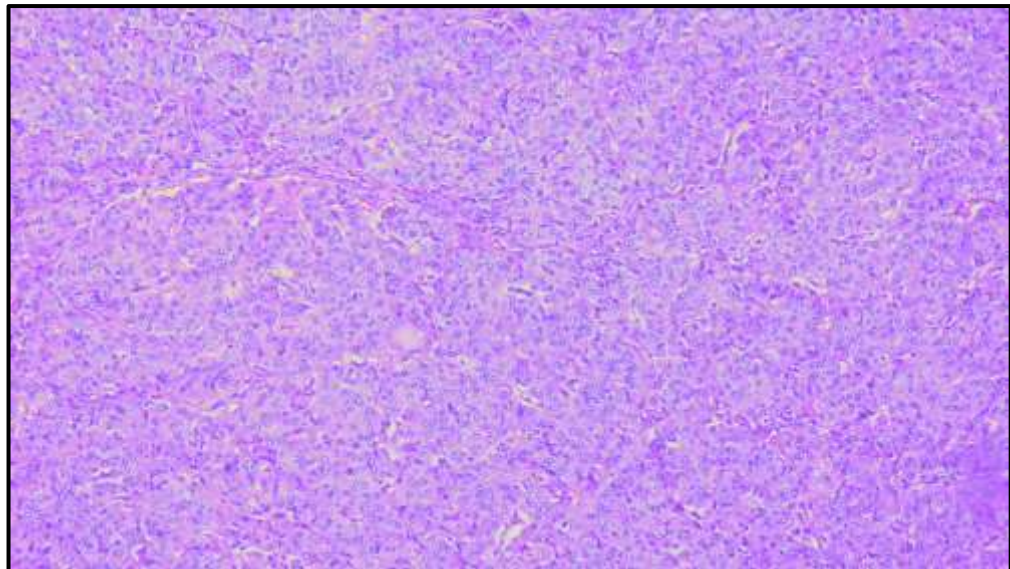


Figura 4. Carcinoma papilar de Tiroides variedad Sólida.

Existen otras variedades de carcinoma papilar de tiroides, como: Microcarcinoma papilar de Tiroides, Carcinoma Papilar de tiroides de células columnares, Carcinoma Papilar de Tiroides variedad células claras, Carcinoma Papilar de Tiroides variedad cribiforme, Carcinoma Papilar de Tiroides variedad oncocítica, Carcinoma Papilar de Tiroides variedad Whartin Like y Carcinoma Papilar de Tiroides variedad en células en tacha (6).

PATOLOGIA MOLECULAR

BRAF V600E

En las últimas décadas hubo un gran avance en los conocimientos de las bases genéticas y moleculares involucradas en el desarrollo de los cánceres de tiroides, que podrán contribuir a una identificación temprana y mejor manejo de aquellos pacientes con mayor riesgo de persistencia o recurrencia de la enfermedad.

- Más del 90% de mutación de BRAF se encuentran en el codón 600 y más del 90% son mutaciones *en un solo nucleótido* dando como resultado un reemplazo de ácido glutámico por valina en la posición 600 (BRAFFV600E)
- La mutación BRAF V600E (mutación BRAF) se ha informado en el 18% a 87% de cánceres de tiroides, e incluso hasta en *69% de los carcinomas papilares de tiroides (CPT) y en 20% a 40% de carcinomas anaplásicos de tiroides (CAT)*.
- Actualmente, la mutación BRAF se está evaluando como una posible herramienta de escrutinio para la extensión de la cirugía tiroidea y como un posible objetivo terapéutico en CPT (10).

La mutación BRAF V600E, ubicada en el cromosoma 7, implica una sustitución de timina por adenina en la posición 1799 en el dominio quinasa del exón 15 y da como resultado un reemplazo de valina-glutamato en la posición 600. Se cree que esta mutación desempeña un papel importante en la patogénesis de CPT a través de la activación de la ruta de proteína cinasa, que afecta la regulación transcripcional y la expresión de varios genes que están implicados en la proliferación celular, la supervivencia y la progresión del cáncer. La mutación BRAF también se cree que inhibe el cotransportador de yoduro de sodio, que facilita la captación de yodo y se ha asociado con CPT que son refractarios a la terapia con yodo radiactivo. (Figura 5)

Chakravarty et al han demostrado que los inhibidores de cinasas que actúan sobre la proteína quinasa activada por mitógeno o BRAF pueden restablecer la avidéz del yodo por los CPT que contienen BRAF mutante (10).

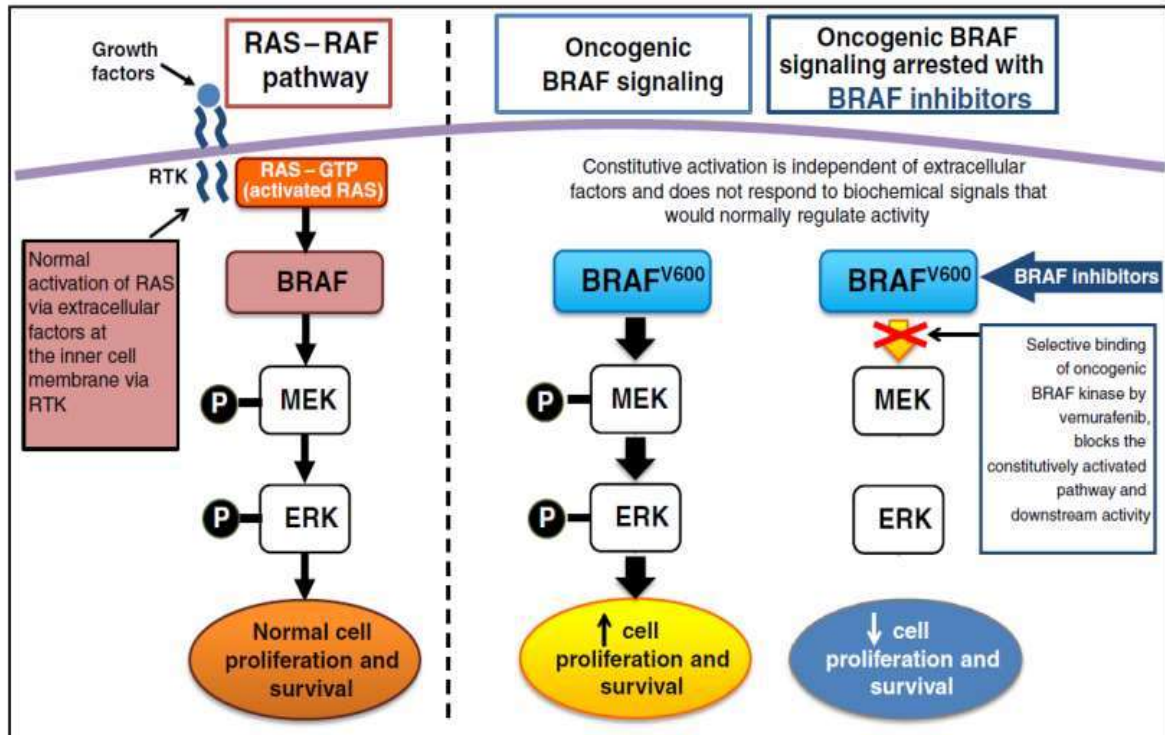


Figura 5. Vía de señalización de la proteína BRAF en su forma oncogénica

Se cree que esta mutación desempeña un papel importante en la patogénesis de CPT a través de la activación de la ruta de proteína cinasa, que afecta la regulación transcripcional y la expresión de varios genes que están implicados en la proliferación celular, la supervivencia y la progresión del cáncer. ⁽¹⁰⁾

En un estudio realizado en el año 2012 en el Hospital Universitario –Dr. José Eleuterio González‖ y que tiene por título. Expresión de los marcadores del ciclo celular Ciclina D1 y P27 y mutación en el gen BRAF en el Carcinoma Papilar intra y extratiroideo.

- La mutación del gen BRAF se observó en 54 casos (75%) de los cuales 29 (53.8%) correspondían a carcinomas papilares extratiroideos mientras que los 25 casos restantes (46.2%) fueron intratiroideos ⁽²⁰⁾. (Figura 6)

	Intratiroideos	Extratiroideos
PRESENTE: 54 (75%)	25 (46.2%)	29 (53.8%)
NEGATIVO: 18(25%)	12 (66.7%)	6 (33.3%)

Figura 6. Presencia de la mutacion BRAF (V600E)

VIA PD/PD-L1

La molécula de muerte programada 1 (PD-1) y sus ligandos PD-L1 y PD-L2 son importantes en el control de la activación de las células T.

- El PD-1 es una molécula de coestimulación que da una señal inhibidora, es un importante regulador negativo de la activación de las células T y participa en el mantenimiento de la tolerancia periférica.
- El PD-1 es una proteína de 288 aa de longitud compuesta por un dominio globular extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular.
- Se han descrito dos ligandos: PD-L1 y PD-L2 (también denominados B7-H1 y B7-DC, respectivamente), ambos son glicoproteínas transmembranales tipo I con dominios extracelulares tipo IgC e IgV.
- El PD-L1 consta de 290 aa codificada por el gen Cd274 localizado en el cromosoma 9 en el humano y en el 19 murino; PD-L2 se codifica en el gen Pdc1lg2 adyacente al gen Cd274-11⁽⁴⁾. (Figura 7).

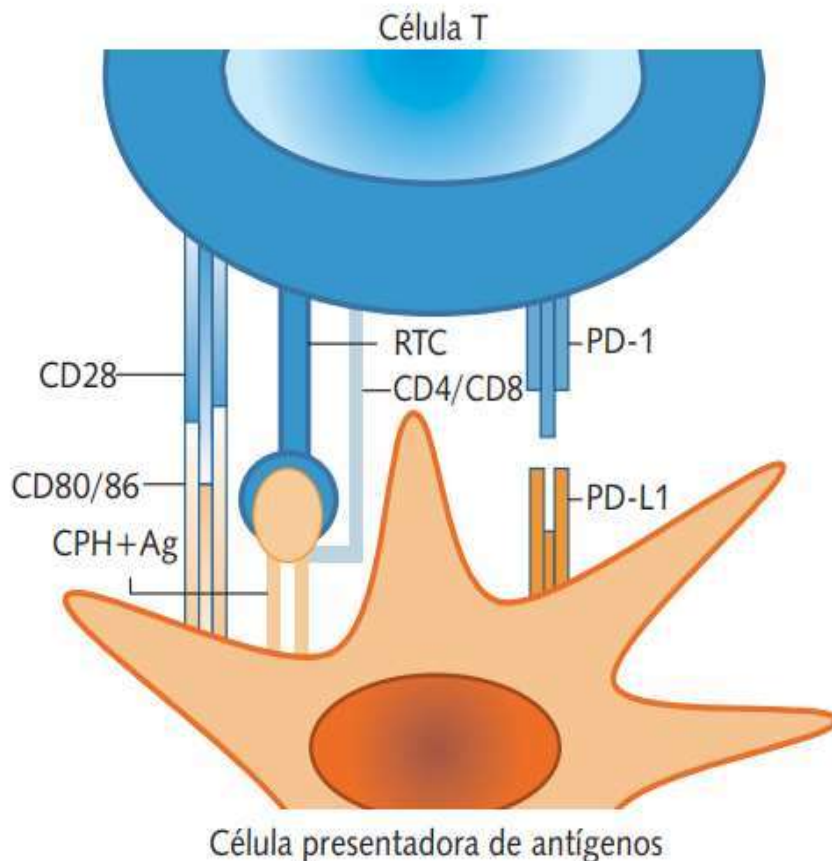


Figura 7. El receptor de la muerte celular programada 1 (PD-1) y la proteína del ligando muerte programada 1 (PD-L1) están implicados en la capacidad de algunos tumores de evadir o suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales de los pacientes, a través de mecanismos que parecen incluir la supresión de CD8 + Células T. En algunos cánceres, la sobreexpresión PD-L1 se asocia con un mal pronóstico

Marco teórico

La terapia inmunitaria inhibitoria de punto de control parece cada vez más plausible como una posible estrategia de investigación para el tratamiento de los cánceres de tiroides, esto lo sugieren los hallazgos tempranos de estudios realizados. (11) (Figura 8)

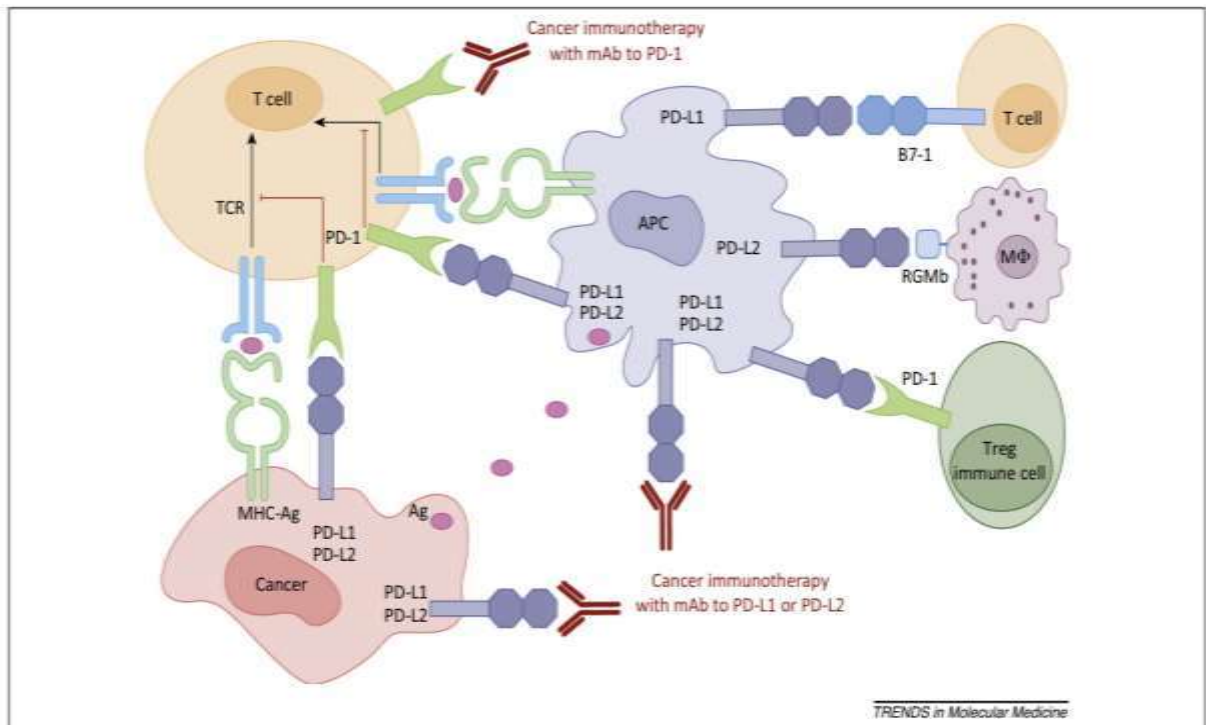


Figura 8. Inmunoterapia contra el cáncer humano con el receptor 1 de la muerte no programada (PD-1) y el ligando 1 de muerte-programado (PD-L1) / anticuerpos L2. Las células presentadoras de antígeno (APC) toman el antígeno (Ag) liberado de las células cancerosas y lo presentan a las células T. Las células cancerosas también pueden presentar Ag a las células T activadas en el contexto del MHC. En la activación de las células T, los receptores PD-1 se expresan en las células T e inhiben la respuesta inmune mediante la participación de PD-L1 y PD-L2 en APC y PD-L1 en células cancerosas. Por lo tanto, el bloqueo específico mediado por anticuerpo monoclonal (mAb) de la ruta PD-1 / PD-L1 / PD-L2 puede potenciar la inmunidad antitumoral. Además de unirse a PD-1, PD-L1 y PD-L2 también se unen a B7-1 y a la molécula de guía repulsiva B, respectivamente. Además de las células T y APC, PD-1 y PD-L1 pueden inducirse en otras células inmunes.

El receptor de la muerte celular programada 1 (PD-1) y la proteína del ligando muerte programada 1 (PD-L1) están implicados en la capacidad de algunos tumores de evadir o suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales de los pacientes, a través de mecanismos que parecen incluir la supresión de CD8 + Células T. En algunos cánceres, la sobreexpresión PD-L1 se asocia con un mal pronóstico. (12,13)

La inhibición dirigida de la vía de control de inmunidad PD-1 / PD-L1 ha generado gran interés en los últimos años como una estrategia prometedora para tratar el melanoma, el cáncer de pulmón de células no pequeñas y los cánceres renales y colorrectales. (14)

Actualmente, los investigadores están explorando el papel de la vía PD-1 / PD-L1 en el cáncer de tiroides con interesantes resultados tempranos en estudios retrospectivos.

Existen estudios cuyos resultados sugieren que la expresión de PD-L1 en células tumorales y microambiente adyacente se correlaciona con Carcinoma Papilar de tiroides metastásico agresivo y una supervivencia acortada, esto podría justificar la aplicación potencial de inmunoterapia anti PD-1 / PD-L1 para estos pacientes refractarios. (15,16)

En estudios recientes los pacientes con células tumorales que expresan PD-L1 tuvieron tiempos de sobrevida media significativamente más cortos que aquellos con células tumorales negativas para PD-L1 (60 meses frente a 186 meses, $P = 0,001$), y los niveles más altos de PD-L1 se observaron en los estadios III-IV de CPT, en comparación con los estadios I-IIA y los nódulos benignos de tiroides.

Por otro lado la inmunopositividad PD-L1 en linfocitos infiltrantes de tumores también se correlacionó con una sobrevida media reducida (17)

En un estudio realizado en el Hospital de Harvard encontraron que los tumores con la mutación BRAF expresan con mayor frecuencia niveles elevados de inmunosupresor ligando 1 de muerte programada (53% frente a 12,5%) y antígeno leucocitario humano G (41% frente a 12,5%) en comparación con los tumores BRAF wild-type.

La mutación de BRAF se ha asociado con un perfil inmunosupresor, que abarca la expresión tumoral directa de ligandos inmunosupresores y el reclutamiento de células supresoras.

Se encontró que los CPT sobre expresan PD-L1 y se encontró con frecuencia en el 53% de los casos, lo que confirma los hallazgos de Cunha *et al.* demostrando un aumento de la tinción de PD-L1 en muestras de cáncer de tiroides en comparación con tejido tiroideo benigno.

Además, la alta tasa de expresión de PD-L1 fue significativamente mayor en los tumores BRAF V600E. PD-L1 funciona inhibiendo células inmunes activadas, tales como las dirigidas contra antígenos expresados por el tumor, y previene la destrucción de células citotóxicas en una variedad de formas, incluyendo la unión con el receptor co-inhibidor, PD-1. La expresión de PD-L1 en el cáncer de tiroides se ha asociado con una serie de indicadores de mal pronóstico, prometiendo anticuerpos antagonistas de la vía PD-1 / PD-L1 actualmente en ensayos clínicos para otros tumores sólidos que deberían considerarse para la inmunoterapia de PTC una vez que estén clínicamente disponibles

(18)

Spiral array y heterogeneidad intratumoral de PD-L1

La expresión de ligando-1 de muerte celular programada (PD-L1) puede predecir la respuesta a los inhibidores de: molécula de muerte celular programada-1 (PD-1), así como al ligando-1 de muerte celular programada (PD-L1) usados en el tratamiento para el cáncer.

Por lo que la evaluación de la expresión de PD-L1 mediante la técnica de inmunohistoquímica se ha vuelto importante como biomarcador para predecir la respuesta a estas terapias. Sin embargo esta área se encuentra poco estudiada debido a la heterogeneidad intratumoral de la expresión de PD-L1, que puede causar resultados falsos negativos.

Estudios previos han reportado un amplio rango de expresión de PD-L1 que oscila entre el 7,4% y el 72,7% de los casos.

Y se ha observado una respuesta terapéutica no solo en pacientes clasificados como PD-L1-positivos por inmunohistoquímica, sino también en algunos pacientes clasificados como PD-L1-negativos por el mismo método, lo que indica la posibilidad de que se haya realizado un muestreo insuficiente del tejido. (22)

Debido a lo anterior, un problema en la valoración de la expresión de PD-L1 en los tejidos es la heterogenicidad de su expresión celular lo que dificulta su interpretación en una biopsia, por lo cual se ha desarrollado una nueva técnica histológica conocida como -SPIRAL ARRAY que consiste en una capa de tejido en sección horizontal del bloque donante y no perforada como cilindro vertical. (21) (figura 9)

- Dado que toda la sección se representa a través de Spiral Array, el sesgo de muestreo debido a la heterogeneidad tisular se reduce en gran medida.

Otras ventajas: rendimiento, uniformidad experimental y la rentabilidad

- *La heterogeneidad intratumoral de la expresión de PD-L1, que puede causar resultados negativos falsos.*

- En un estudio previo (Oct 17). El objetivo fue evaluar la heterogeneidad intratumoral de la expresión PD-L1 en 138 muestras de cáncer de pulmón resecadas quirúrgicamente mediante Spiral Arrays.

Los patrones de tinción heterogéneos y homogéneos de la expresión de PD-L1 fueron idénticos entre los spiral array y las secciones de tejido completo en los 6 casos seleccionados al azar ⁽²²⁾. (Figura 10)

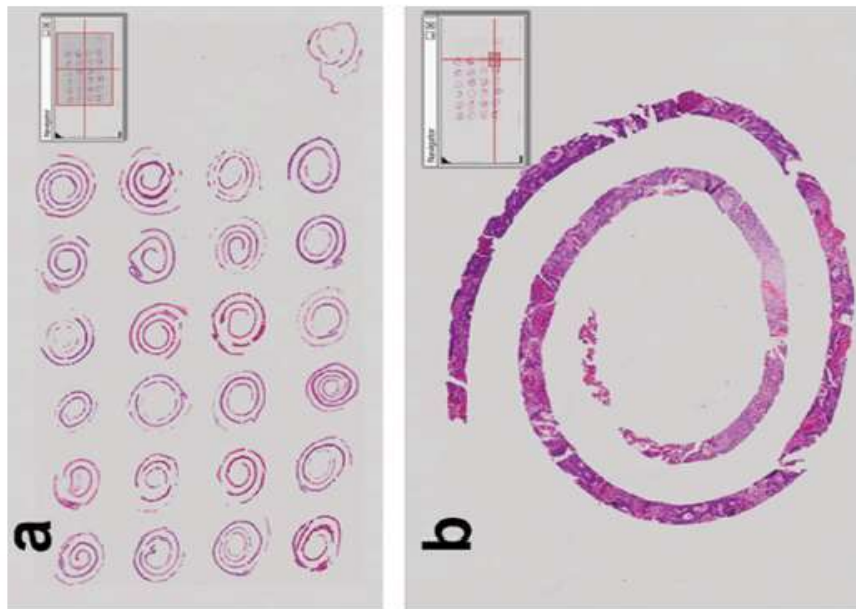


Figura 9. Técnica de spiral array

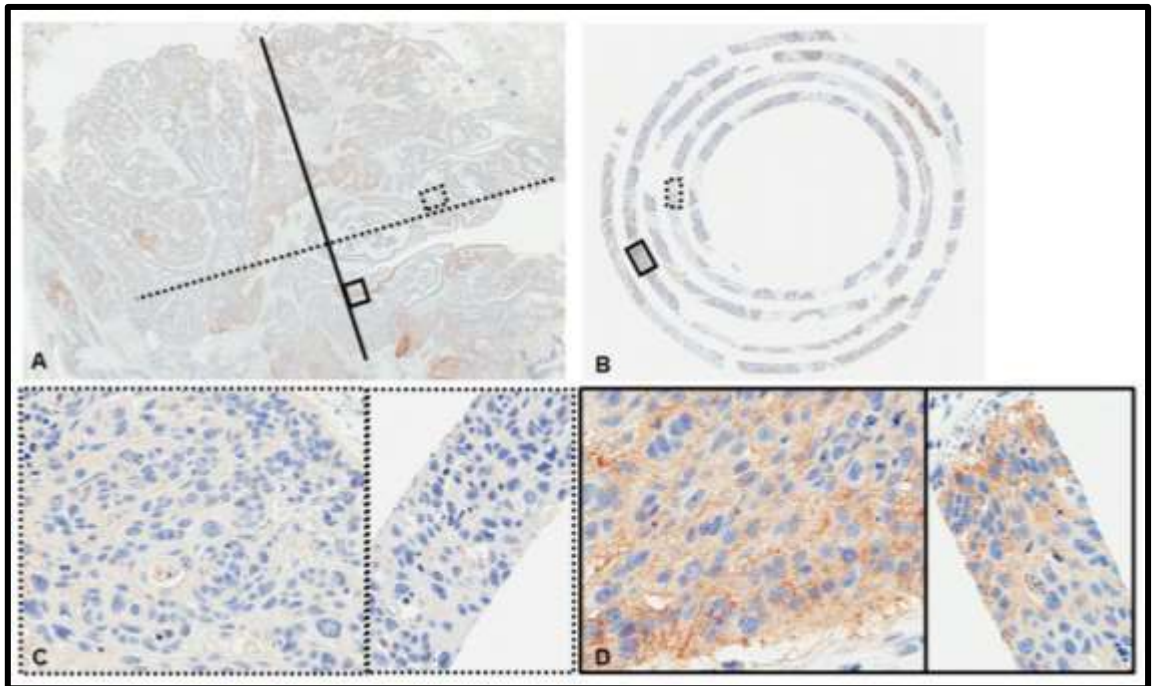


Figura 10. Expresión heterogénea de PD-L1

JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha no hay artículos publicados sobre la expresión de PDL1 y la relación con BRAF en nuestro medio.

Determinaremos la expresión de PDL1 en carcinoma papilar de tiroides mediante la técnica de spiral array y la correlación de la expresión de PDL-1 con la presencia de la mutación BRAF en población latina.

Si esto se comprueba una alta expresión de PD-L1 estará relacionado con una conducta biológica más agresiva del Carcinoma Papilar de Tiroides y podríamos identificar a esos pacientes ya que requieren un tratamiento más agresivo así como un seguimiento con vigilancia más estrecha y en un futuro terapia inmunitaria inhibitoria

HIPOTESIS

La expresión de PDL1 en las células tumorales se correlaciona positivamente con la mutación V600E del gen BRAF en el carcinoma papilar de tiroides.

Hipótesis nula

La expresión de PDL1 en las células tumorales del carcinoma papilar de tiroides, no se correlaciona positivamente con la mutación V600E del gen BRAF.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de PD-L1 en Carcinomas Papilares de Tiroides con mutación V600E del gen BRAF mediante la técnica de Spiral Array

Objetivos secundarios

1. Describir la expresión de PDL-1 en las células epiteliales del carcinoma papilar de tiroides.
2. Correlacionar la expresión de PDL-1 y la mutación BRAF con la variedad histológica del tumor.
3. Correlacionar la expresión de PDL-1 y la mutación BRAF con el tamaño tumoral y grado de extensión tumoral.

MATERIAL Y METODOS

Diseño metodológico del estudio:

Se trata de un estudio observacional, transversal, comparativo, retrospectivo y no ciego

Características de la población:

1. Número Pacientes: 44

2. Características de la población:

A.- Criterios de inclusión:

Especímenes de glándula tiroides que cuenten con:

- Bloque de parafina
- Reporte anatomopatológico
- Diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides.
- Con mutación V600E del gen BRAF en el tejido tumoral

B.- Criterios de exclusión:

Especímenes de glándula tiroides que muestren:

- Tejido insuficiente para realizar estudio de inmunohistoquímica
- Defectos de fijación

C.- Criterios de eliminación:

Especímenes de glándula tiroides que no cuenten con:

- Bloque de parafina

D.- Lugar de referencia y método de reclutamiento: Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario –Dr José Eleuterio González

Tamaño de la muestra con cálculo de la n:

ESTIMACIÓN DE UNA PROPORCIÓN EN UNA POBLACIÓN INFINITA				
$N = \frac{(Z\alpha)^2 (p)(q)}{\delta^2}$				
		al cuadrado		
valor Z	1.96	3.8416		
valor p	0.80			n= 42.6844444
valor q	0.20			
valor δ	0.12	0.0144		

N= Tamaño de la muestra que se requiere.
p= Proporción de sujetos portadores del fenómeno en estudio.
q= 1-p (complementario, sujetos que no tienen la variable de estudio)
δ= Precisión o magnitud del error que estamos dispuestos a aceptar.
Zα= distancia de la media del valor de significación propuesto.

Figura 11

Se realizó un cálculo de tamaño de muestra con una fórmula de estimación de una proporción en una población infinita a partir de una prevalencia de 80% de carcinoma papilar de tiroides con mutación de BRAF positiva, con una confianza bilateral de 95% y una precisión de 12% se requieren al menos 43 sujetos de estudio (Figura 11 y 12)

Poder (1-β) %	Valor Z	Nivel de significación (α)	
		Una cola	Dos colas
99.0	2.33	0.01	0.02
97.5	1.96	0.025	0.05
95.0	1.64	0.05	0.1
90.0	1.28	0.1	0.2
85.0	1.04	0.15	0.3
80.0	0.84	0.2	0.4
75.0	0.67	0.25	0.5
70.0	0.52	0.3	0.6
60.0	0.25	0.4	0.8

Figura 12

Entre los casos seleccionados se encuentran los siguientes subtipos histológicos: carcinoma papilar clásico, variante folicular, variante células altas, carcinoma anaplásico originado en un carcinoma papilar y micro carcinoma.

Los casos se enlistaron previamente en dos grupos de acuerdo a las características histopatológicas:

- *Grupo I.* Carcinomas papilares intratiroides.
En este grupo se incluyeron los casos diagnosticados como microcarcinoma papilar (porque su diámetro mayor es menor a 1cm) y aquellos casos en los que no existía invasión franca a los tejidos blandos
- *Grupo II.* Carcinomas papilares extratiroides.
En este grupo se incluyeron los casos en los que existe invasión franca a los tejidos blandos extratiroides (músculo, tejido adiposo, y órganos adyacentes) y o metástasis a los ganglios linfáticos regionales.

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ESTUDIO:

1. De una base de datos previamente realizada (en la que no se revelara la identidad del paciente ya que todas las muestras recibidas son identificadas con un número de folio que se asigna al bloque de parafina en el departamento, además solo son manejadas por personal interno del departamento y si hubiera alguna publicación sobre el estudio, su identidad será protegida) de los archivos de del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario –Dr. José Eleuterio GonzálezII, se recabaron los casos de Carcinoma Papilar de tiroides que tuvieran presente la mutación V600E del gen BRAF los cuales se establecieron en el protocolo de tesis –Expresión de los marcadores del ciclo celular Ciclina D1 y P27 y mutación en el gen BRAF en el Carcinoma Papilar intra y extratiroides (Clave de registro: AP12-002)II

2.- Se buscará si se cuenta con los bloques de parafina y tejido suficiente para realizar los estudios de inmunohistoquímica.

3.- Construiremos spiral array de cada uno de los bloques de parafina seleccionados de la siguiente manera: Los bloques se calentaran a aproximadamente 40 C en la superficie, y se cortaran secciones de 100 micras de espesor con un micrótopo estándar. Las secciones de tejido se calentaran a 35°C, se aplanan y se colocan en láminas planas de parafina seccionadas a un grosor de 100 micras desde los bloques de parafina.

Luego, las secciones de tejido, junto con la lámina de parafina plana, se enrollan manualmente en carretes de tejido.

Cada carrete de tejido se corta en un carrete subcilíndrico de 3 mm de altura. Los subcilindros se cortan en el centro de los carretes sin mayor sesgo. Cada carrete subcilíndrico se inserta verticalmente en un casete de soporte de tejido metálico con 16 agujeros, cada uno de 3 mm de diámetro

Los casetes de plástico se colocan en los moldes de metal donde la superficie inferior de los moldes se cubrió con cinta adhesiva. La parafina fundida se vierte en el cartucho para volver a incrustar el tejido enrollado; este paso es seguido por un período de enfriamiento. Por último, después de retirar los moldes y la cinta adhesiva, el bloque de Spiral Array se secciona a 4 mm (Figura 13,14 y 15).

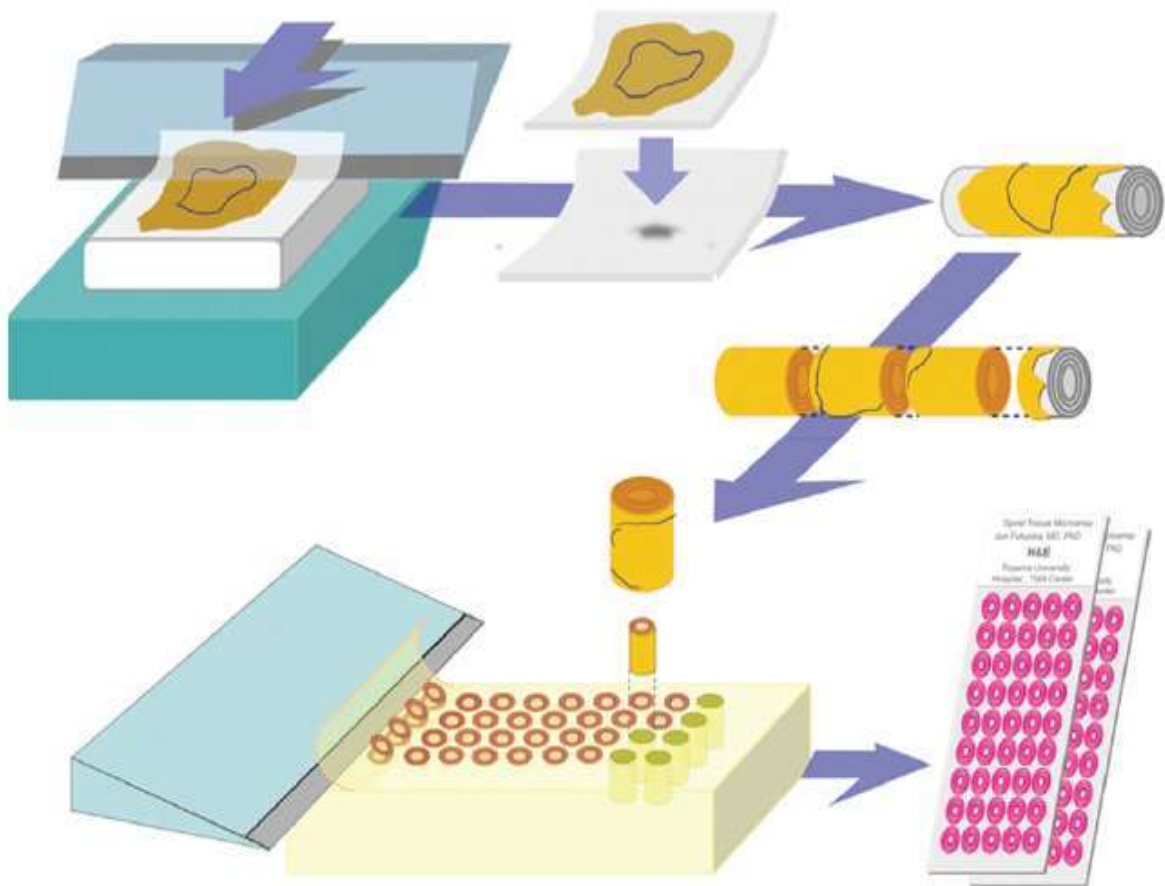


Figura13. Esquema de la construcción de spiral arrays



Figura 14. Resultado final de la construcción de los Spiral Arrays.

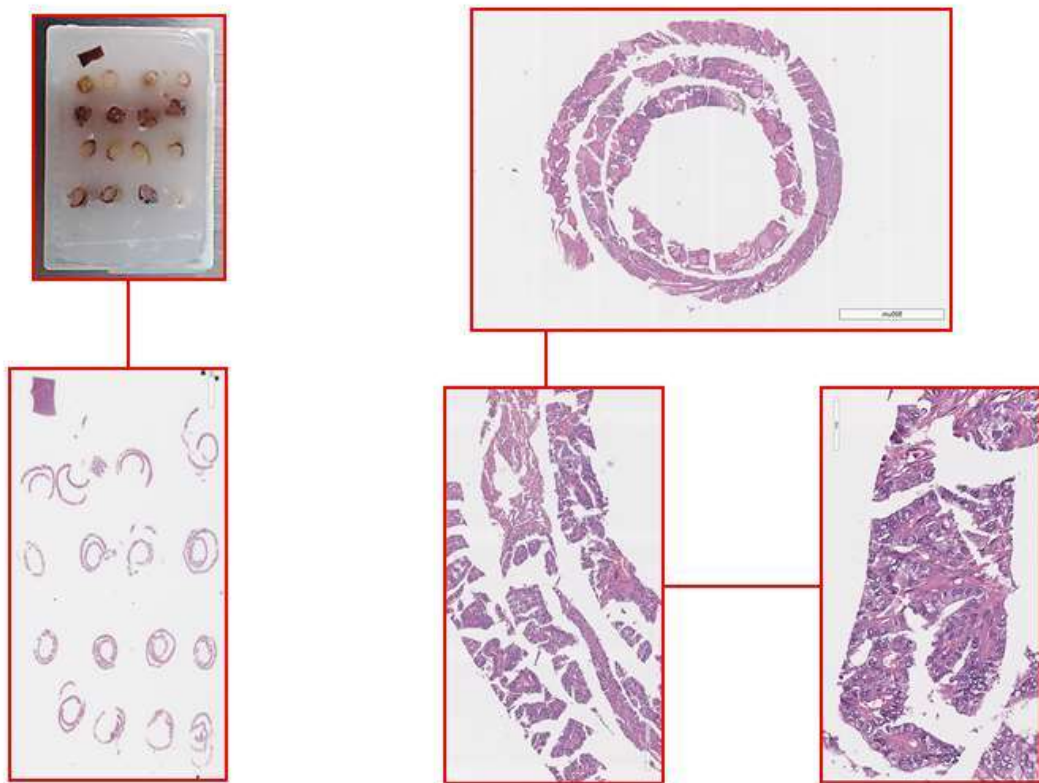


Figura 15. Cortes histológicos con secciones de 4 μ m de espesor a partir de los bloques de Espiral Array para posterior evaluación histopatológica (HyE)

4. Seleccionaremos un anticuerpo aprobado anti-PD-L1 (clona 28-8, Abcam). Realizaremos la tinción de inmunohistoquímica utilizando un sistema de tinción automático (Ventana).

Las diluciones de anticuerpos se optimizarán a 1: 100. Los portaobjetos se desparafinan y se rehidratan usando agua destilada, y posteriormente se procesan para PD-L1 (recuperación de antígeno inducida por calor a pH 9,0). Utilizando como control positivo amígdala.

5. Evaluaremos la expresión de PD-L1 solo en células tumorales. Intentaremos excluir las células inmunitarias intratumorales, así como los macrófagos y los linfocitos. Definiremos la positividad de PD-L1 como cualquier célula tumoral que expresa PD-L1 en la membrana celular a cualquier intensidad.

La interpretación de la tinción de inmunohistoquímica se realizó por un patólogo experto.

Se evaluó la intensidad y proporción en localización de membrana y citoplasma y patrón mixto.

La intensidad se graduó en leve, moderada y fuerte en una escala visual.

En cuanto a la proporción se consideró como positivo cualquier intensidad lineal de la membrana citoplasmática parcial o completa que pueda diferenciarse del fondo (23).

Se realizaron 4 spiral array por cada caso, y cada spiral se evaluó de forma independiente y en conjunto para obtener un promedio de la intensidad y proporción de cada caso.

La detección previa de la mutación de BRAF V600E se utilizó método de PCR en tiempo real.

ANALISIS ESTADISTICO

Para su análisis estadístico se realizó una prueba comparativa (Chi cuadrada X2) para buscar la asociación entre las diferentes variables.

Se analizó la asociación entre las categorías de estudio del carcinoma papilar de tiroides con mutación de BRAF presente y comparando la expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1. Se tomó como valor estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

El análisis de frecuencia se realizó en los grupos de estudio positivos y negativos para PD-L1 con sus variables y se tomó como valor estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

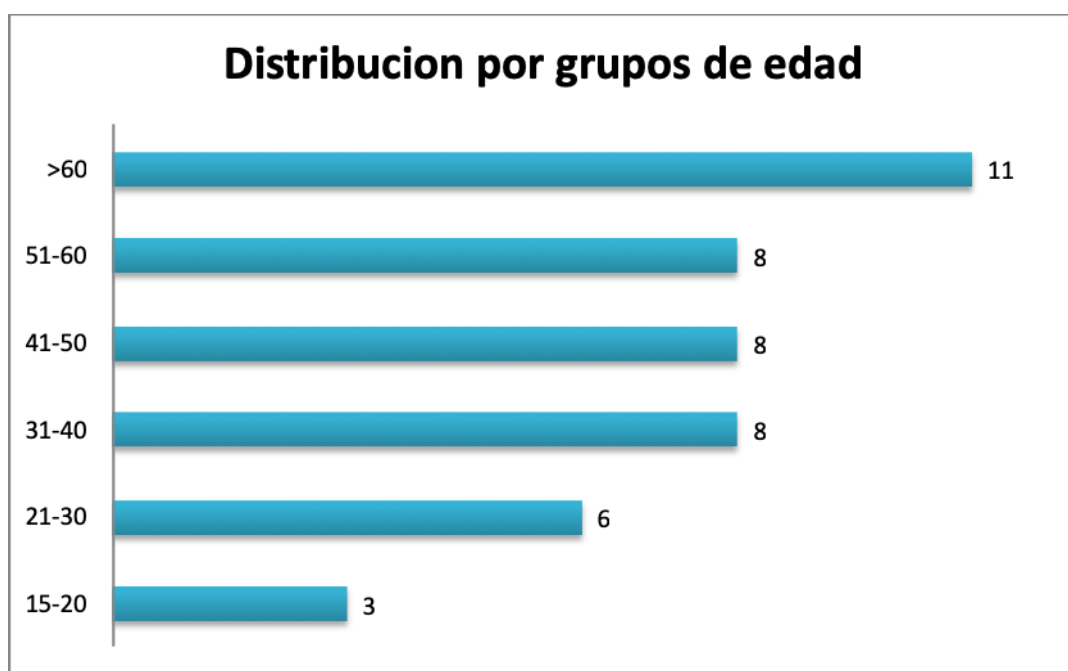
Se utilizó el programa computacional SPSS versión 24 (SPSS Inc. Software)

RESULTADOS

DATOS GENERALES

Se identificaron 44 casos de carcinoma papilar de tiroides los cuales cumplieron con todos los criterios de inclusión

El rango de edad fue de 18 a 71 años y el promedio fue de 45 años.



Grafica de distribucion por grupos de edad

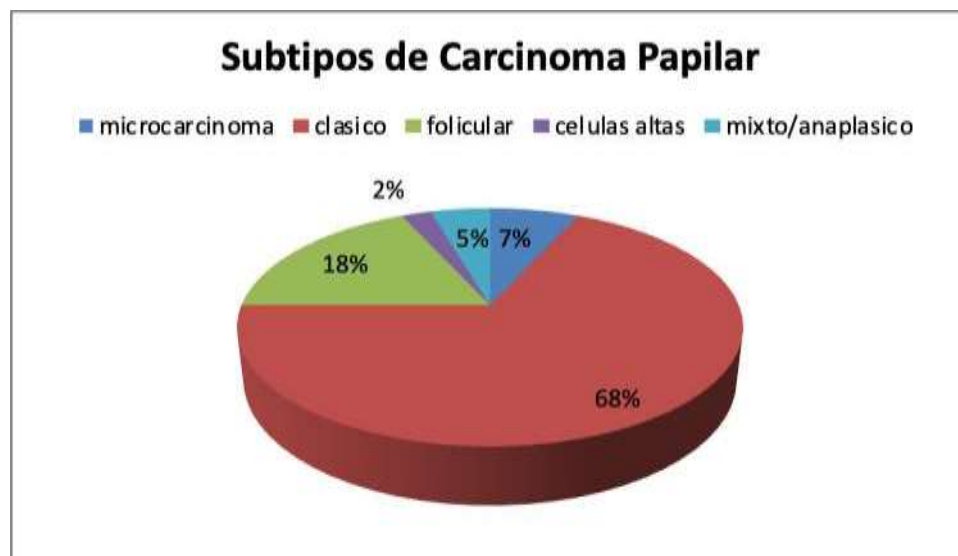
Según la distribución por sexo, el 82% (36 casos) fueron del sexo femenino y el 18% (8 casos) del sexo masculino



Grafica de la distribucion por sexo

CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS

Se incluyeron varios subtipos de carcinoma papilar, de los cuales el tipo clásico fue el más frecuente con el 68% (30 casos), seguidos en orden decreciente por los tipo folicular 18% (8 casos), microcarcinoma 7% (3 casos), tipo anaplásico originado en carcinoma papilar 5% (2 casos) y tipo células altas 2% (1 caso).

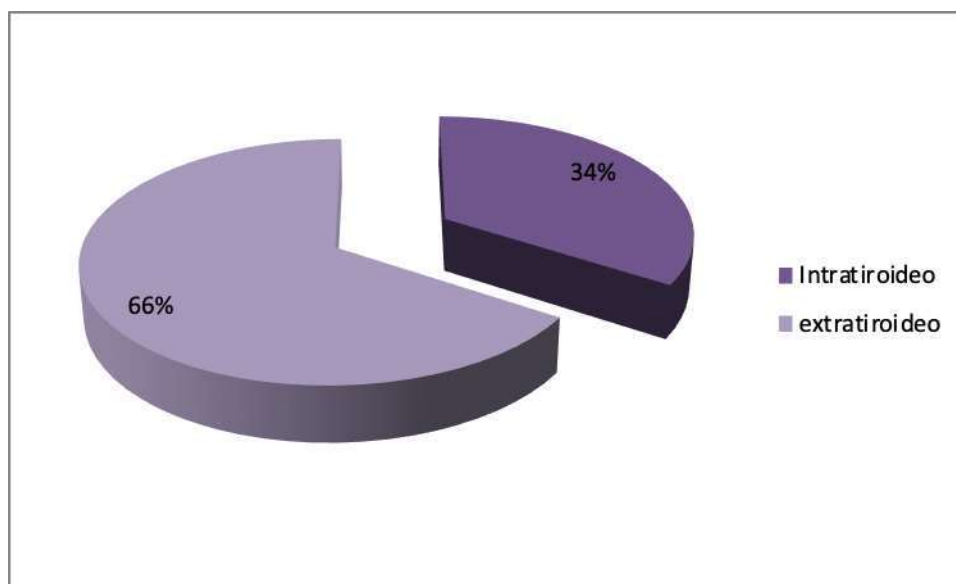


Grafica de los subtipos de carcinoma papilar de tiroides

Según la extensión del tumor, los casos se dividieron en 2 grupos:

- Grupo I. *Carcinoma intratiroides*: 15 casos (34%)
- Grupo II. *Carcinomas extratiroides*: 29 casos (66%)

En el grupo de carcinomas intratiroides se incluyen los microcarcinomas que por definición son de tamaño menor a 1 cm, 3 casos (6.81%)

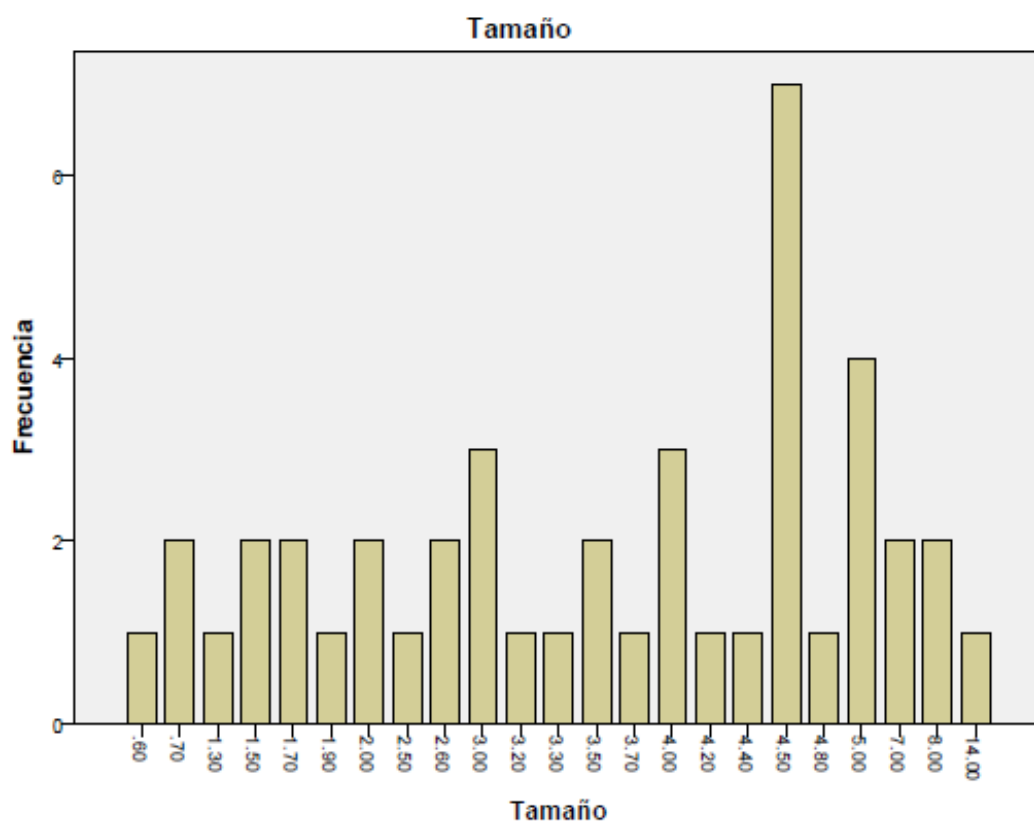


Grafica de los los grupos según la extensión del tumor

El tamaño tumoral fue de 0.6 a 14cm, con un promedio de 3.8cm.

Tamaño tumoral	Intratiroides	Extratiroides
0-1cm, 3 (6.8%)	3 (100%)	0
1.1-2 cm, 8 (18.1%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)
2.1-3cm, 6 (13.6%)	1 (16.6%)	5 (83.3%)
3.1-4cm, 8 (18.1%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)
>4.1cm, 19 (43.1%)	3 (15.7%)	16 (84.2%)

Tabla de los carcinomas intra y extratiroides por tamaño tumor

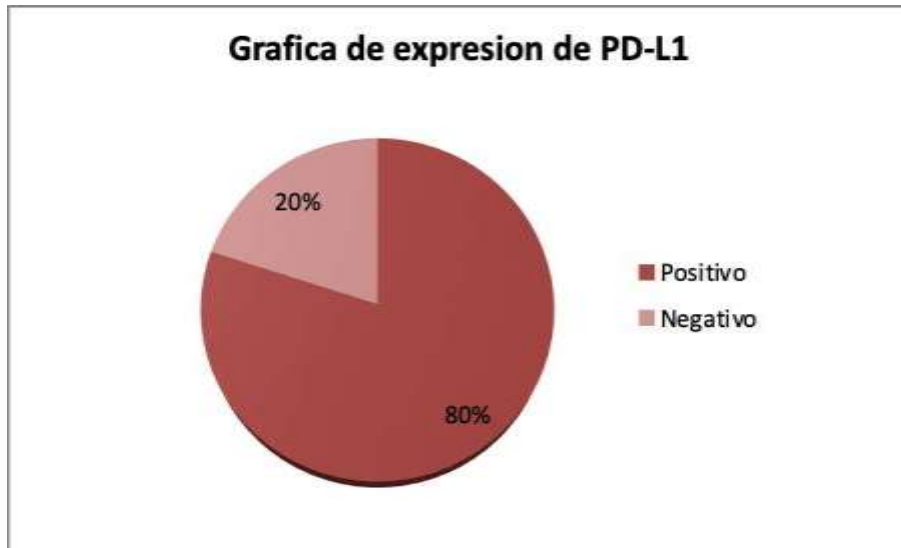


Grafica con la distribución de casos por tamaño tumoral

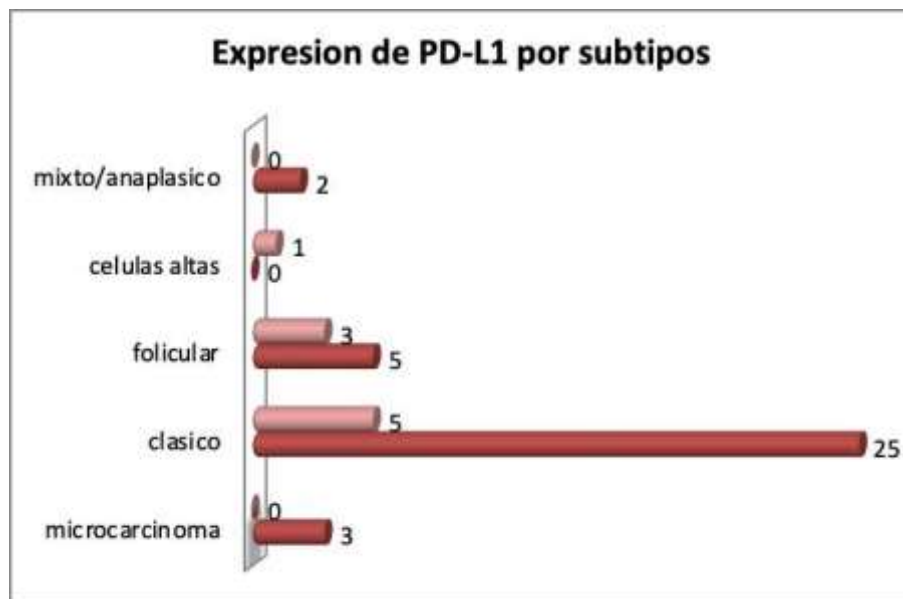
Expresion del marcador de inmunohistoquimica PD-L1

La *positividad* de expresion de PD-L1 se observó en la mayoría de los casos estudiados: 35 casos (80%) de los cuales 25 (71%) correspondieron a carcinoma papilar clasico, tipo folicular 5 casos (14%), microcarcinoma 3 casos (8.5%) y anaplásico originado en carcinoma papilar 2 casos (6%).

La *negatividad* de la expresion de PD-L1 se observo en 9 casos (20%) de los cuales: 5 casos (55%) correspondieron a carcinoma papilar clasico, tipo folicular 3 casos (33%) y celulas altas 1 caso (11%).



Grafica de la expresion de PD-L1



Grafica de la expresion de PD-L1 de los subtipos histologicos de Carcinoma Papilar

Spiral arrays

En todos los casos realizamos marcador de inmunohistoquímica PD-L1 utilizando spiral arrays de tejido que consistían en 4 de cada tumor o paciente.

En algunos casos no fue posible conservar los 4 spiral array debido a defectos en la técnica histológica tejido se perdió un espiral array en algunos casos.

El número de spiral array de los casos positivos es el siguiente: 32 casos (91.42%) con 4 espiral array y 3 casos (8.57%) con 3 espiral array evaluables.



Grafica del numero de Spiral Array evaluado por paciente

Con el siguiente número de spiral array positivos:

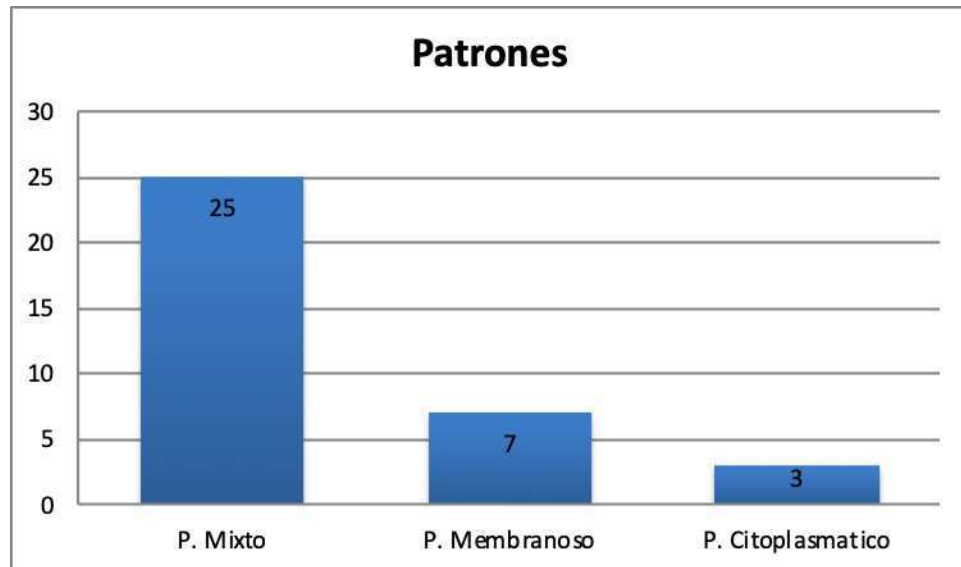
	Con 1 spiral array	Con 2 spiral array	Con 3 spiral array	Con 4 piral array
Casos	9	8	14	4
Porcentaje%	25.71	22.85	40	11.42

Tabla con el numero de espiral array positivos por caso

PATRONES DE TINCION

Se evaluo la inmunoreactividad en los patrones membranoso, citoplasmático y mixto.

Se observo positividad en un patron mixto (membrana y citoplasma) 25 casos (71.42%), con patron membranoso 7 casos (20%) y con patron citoplasmático 3 casos (8.57%).

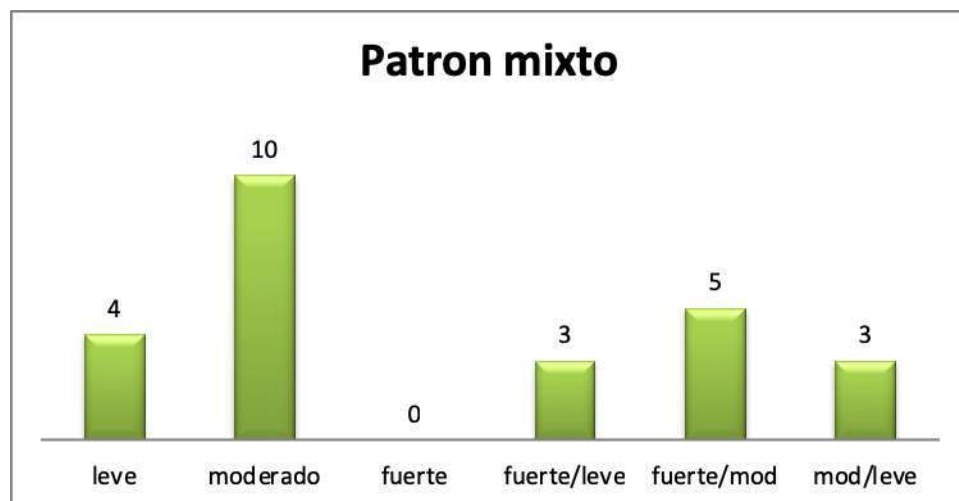


Grafica con los patrones de tincion

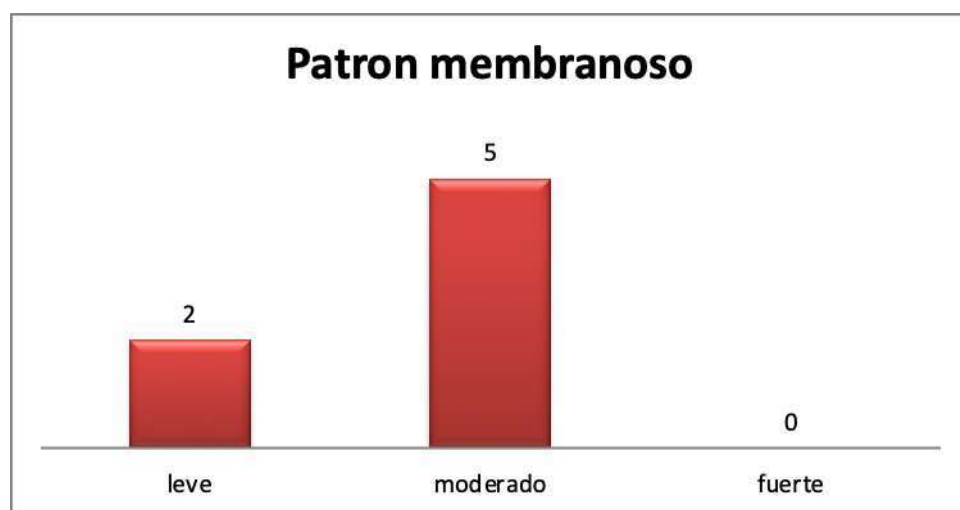
INTENSIDAD

Por patrones se observo lo siguiente:

- *Patron mixto*: 14 casos (56%) con misma intensidad en membrana y citoplasma y 11 casos (44%) con la misma intensidad. Las intensidades observadas fueron leve, moderada y fuerte.
- *Patron membranoso*: 2 casos (28.57%) con intensidad leve, 5 casos (71.42%) con intensidad moderada.
- *Patron citoplasmatico*: 2 casos (66.66%) con intensidad leve y 1 caso (33.33%) con intensidad moderada.



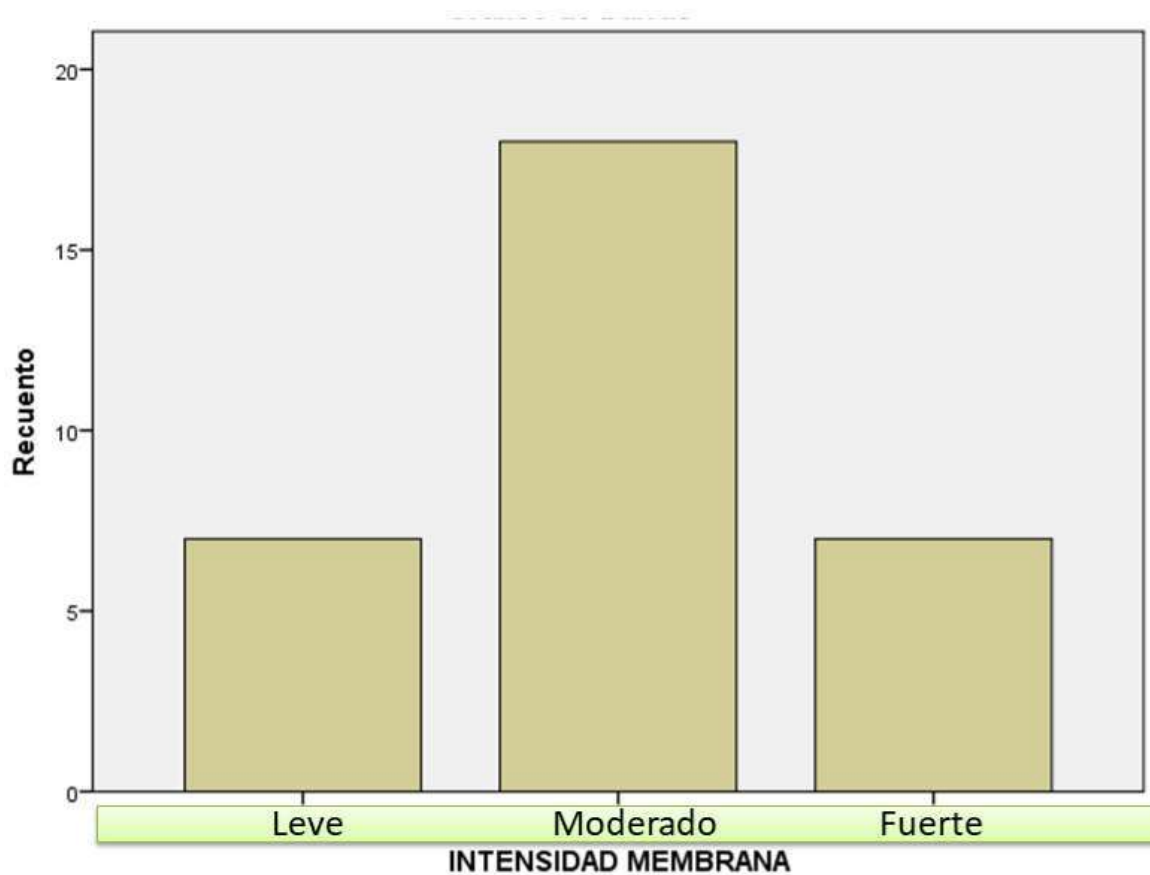
Grafica con los casos positivos con patron mixto (membranoso y citoplasmatico) con misma y diferente intensidad



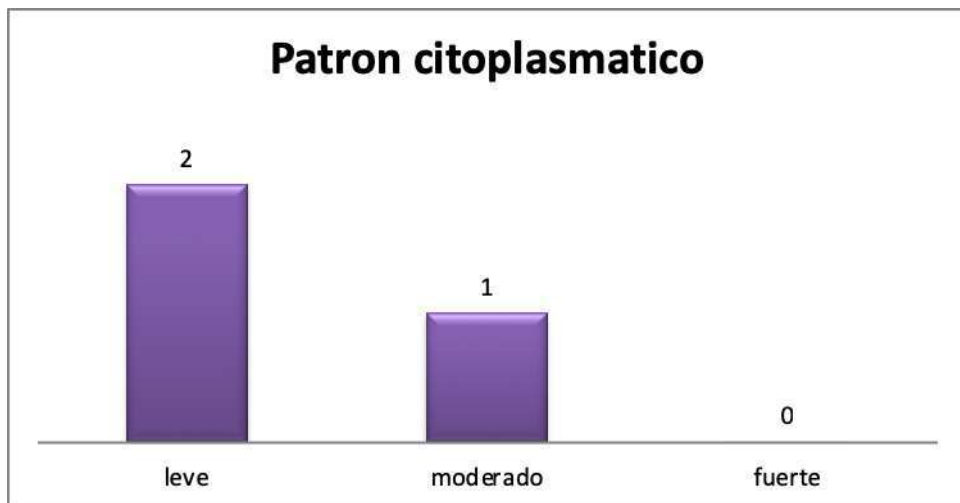
Grafica con los casos positivos con patron membranoso

			Estado	
PD-L1			POSITIVO	Total
INTENSIDAD MEMBRANA	LEVE	Recuento	7	7
		% dentro de Estado	21,9%	21,9%
	MODERADA	Recuento	18	18
		% dentro de Estado	56,3%	56,3%
	FUERTE	Recuento	7	7
		% dentro de Estado	21,9%	21,9%
Total		Recuento	32	32
		% dentro de Estado	100,0%	100,0%

Tabla. Total de casos positivos con patron membranoso, incluyendo los casos presentes en el patron mixto.



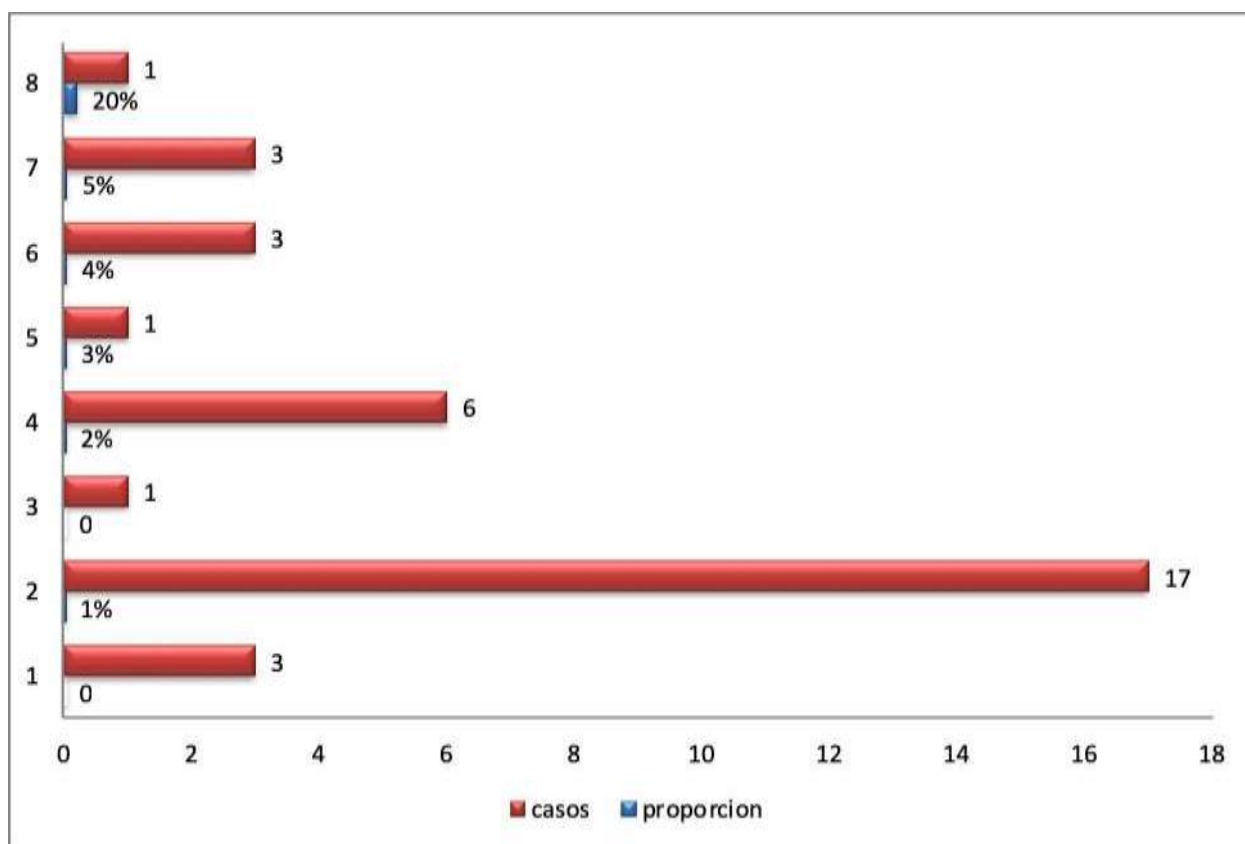
Grafica . Total de casos positivos con patron membranoso, incluyendo los casos presentes en el patron mixto.



Grafica con los casos positivos con patron citoplasmatico

PROPORCION

El rango de proporción observada fue de <1% hasta el 20% con el siguiente número y distribución de casos en orden decreciente: 1% diecisiete casos (48.57%), 2% 6 casos (17.14%), <1% tres casos (8.57%), 4% tres casos (8.57%), 5% tres casos (8.57%), 1.5% un caso (2.85%), 3% un caso (2.85%) y 20% un caso (2.85%).



Grafica de la proporción de positividad de PD-L1

Expresion de PD-L1 en relacion al tamaño y extension tumoral

En relacion tamaño tumoral se observo la siguiente expresion:

Tamaño tumoral	Casos positivos	Casos negativos
0-1cm, 3 (6.8%)	3 (8.5%)	0
1.1-2 cm, 8 (18.1%)	4 (11.4%)	4 (44.4%)
2.1-3cm, 6 (13,6%)	6 (17.1%)	0
3.1-4cm, 8 (18.1%)	6 (17.1%)	2 (22.2%)
>4.1cm, 19 (43,1%)	16 (45.7%)	3 (33.3%)

Tabla de la distribucion del inmunorreactividad de PD-L1 en relacion al tamaño tumoral

En relacion a la extension del tumor se observo la siguiente expresion:

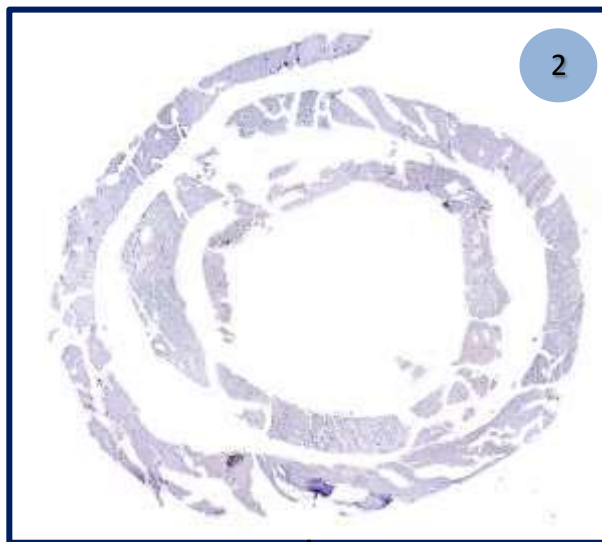
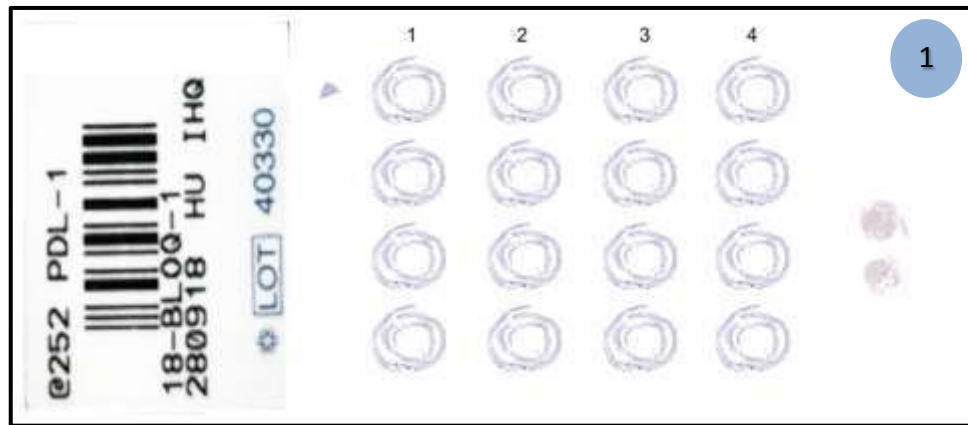
	Intratiroideos	Extratiroideos
<i>Casos positivos</i>	11 (73,3%)	24 (82,7%)
<i>Casos negativos</i>	4 (26.6%)	5 (17.2%)

Tabla de la distribucion del inmunorreactividad de PD-L1 en relacion a la extension tumoral

Tabla del análisis estadístico de la comparación en la expresión de PD-L1 con cada uno de los parámetros histológicos estudiados.

Variable	PD-L1 (+)		PDL-1 (-)		Valor p
Total de casos	35	80%	9	20%	
Patrón de tinción					
• Membrana	7	20%			0.389
• Citoplasma	3	8.5%			
• Mixto	25	71,4%			
Sub variante histológica					
• Microcarcinoma	3	8.5%	0	-	0.143
• Clásico	25	71.4%	5	55.5%	
• Folicular	5	14.2%	3	33.3%	
• Células altas	0	-	1	11.1%	
• Mixto/anaplásico	2	5.7%	0	-	
Tamaño tumoral					
• 0-1 cm	3	8.5%	0	-	0.008
• 1.1-2 cm	4	11.4%	4	44.4%	
• 2.1-3 cm	6	17.1%	0	-	
• 3.1-4 cm	6	17.1%	2	22.2%	
• > 4.1 cm	16	45.7%	3	33.3%	
Extensión tumoral					
• Intratiroideo	11	31,4%	4	44,4%	0.464
• Extratiroideo	24	68,5%	5	55,5%	

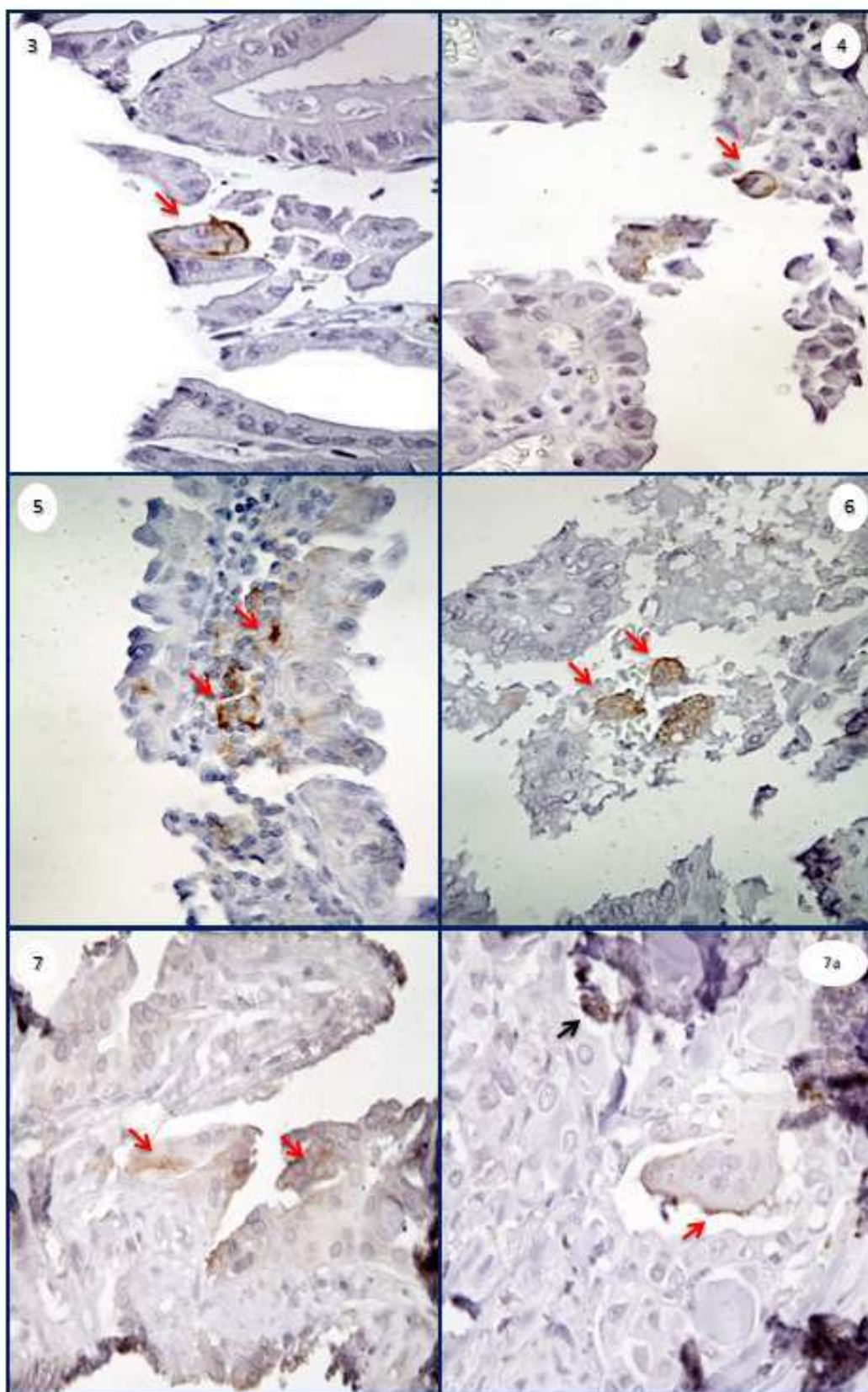
Expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1



Imágenes del marcador de inmunohistoquímica PD-L1

- 1.** Imagen esquemática de los 4 casos incluidos por laminillas, teñidos con inmunohistoquímica para PD-L1
- 2.** Imagen a gran aumento de un spiral array, que representa el caso número 5, el cual fue positivo en los 4 espirales en un patrón mixto, es decir membranoso y citoplasmático con intensidad moderada en un 4%.
 - 2a.** Fotomicrografía de un acercamiento a 40x del caso número 5, (flechas) tinción citoplasmática y membranosa circunferencia parcial con intensidad moderada.
 - 2b.** Fotomicrografía de un acercamiento a 40x del caso número 5, (flechas) tinción membranosa circunferencia parcial con intensidad leve
 - 2c.** Fotomicrografía de un acercamiento a 40x del caso número 5, (flecha) membranosa circunferencia completa con intensidad moderada.

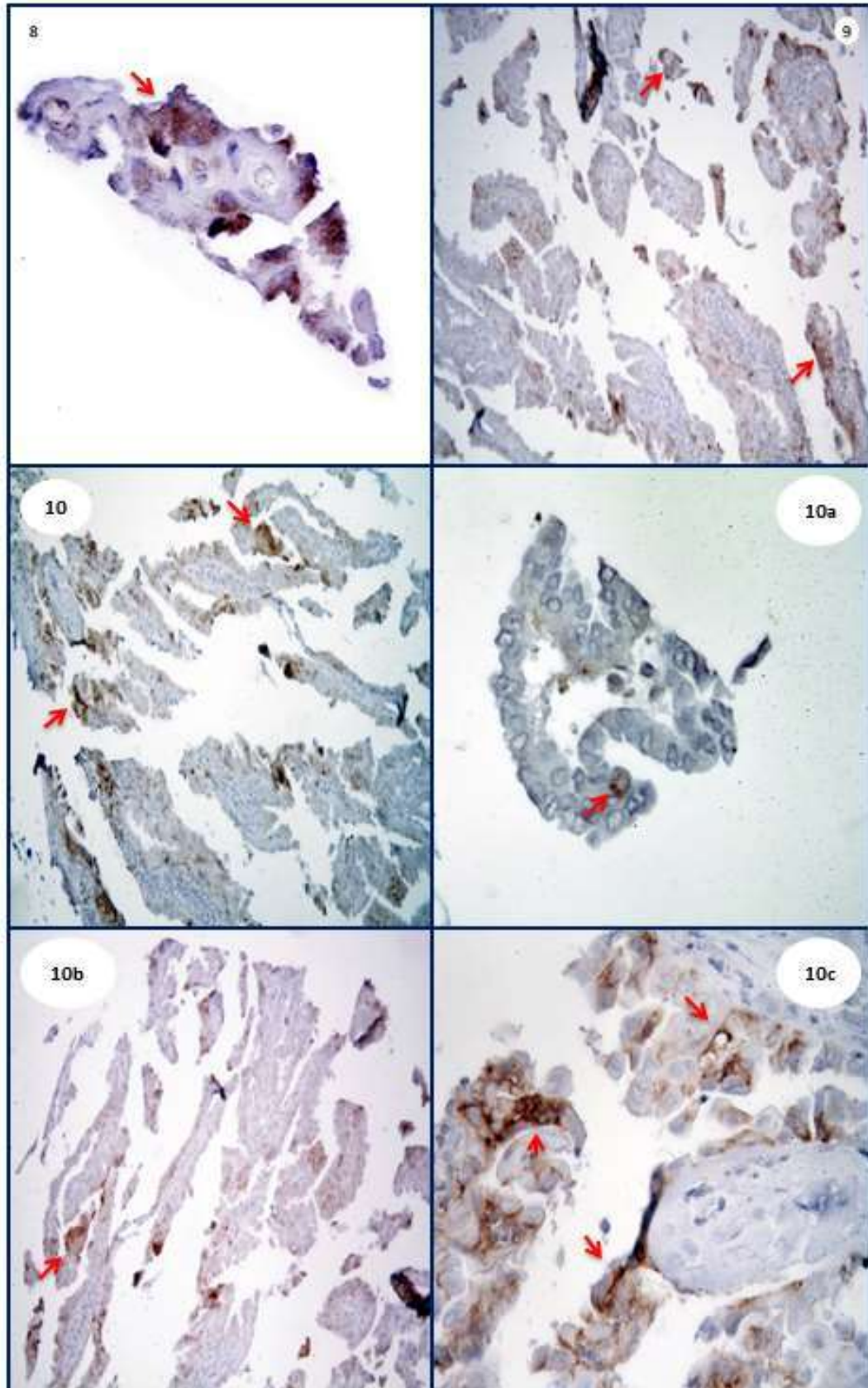
Expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1



Imágenes del marcador de inmunohistoquímica PD-L1

3. Fotomicrografía (40x) del caso número 1. Tinción membranosa circunferencias parcial con intensidad moderada (flecha)
4. Fotomicrografía (40x) del caso número 2. Tinción membranosa circunferencias completa con intensidad moderada (flecha)
5. Fotomicrografía (40x) del caso número 5. Tinción citoplasmática con intensidad moderada (flecha)
6. Fotomicrografía (40x) del caso número 7. El cual fue negativo para PD-L1. La flecha señala macrófagos inmunorreactivos.
7. Fotomicrografía (40x) del caso número 9. Tinción membranosa circunferencial parcial con intensidad leve (flecha)
- 7a.** Fotomicrografía (40x) del caso número 9. Tinción citoplasmática con intensidad moderada (flecha negra) y tinción membranosa circunferencial incompleta con intensidad moderada (flecha roja)

Expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1



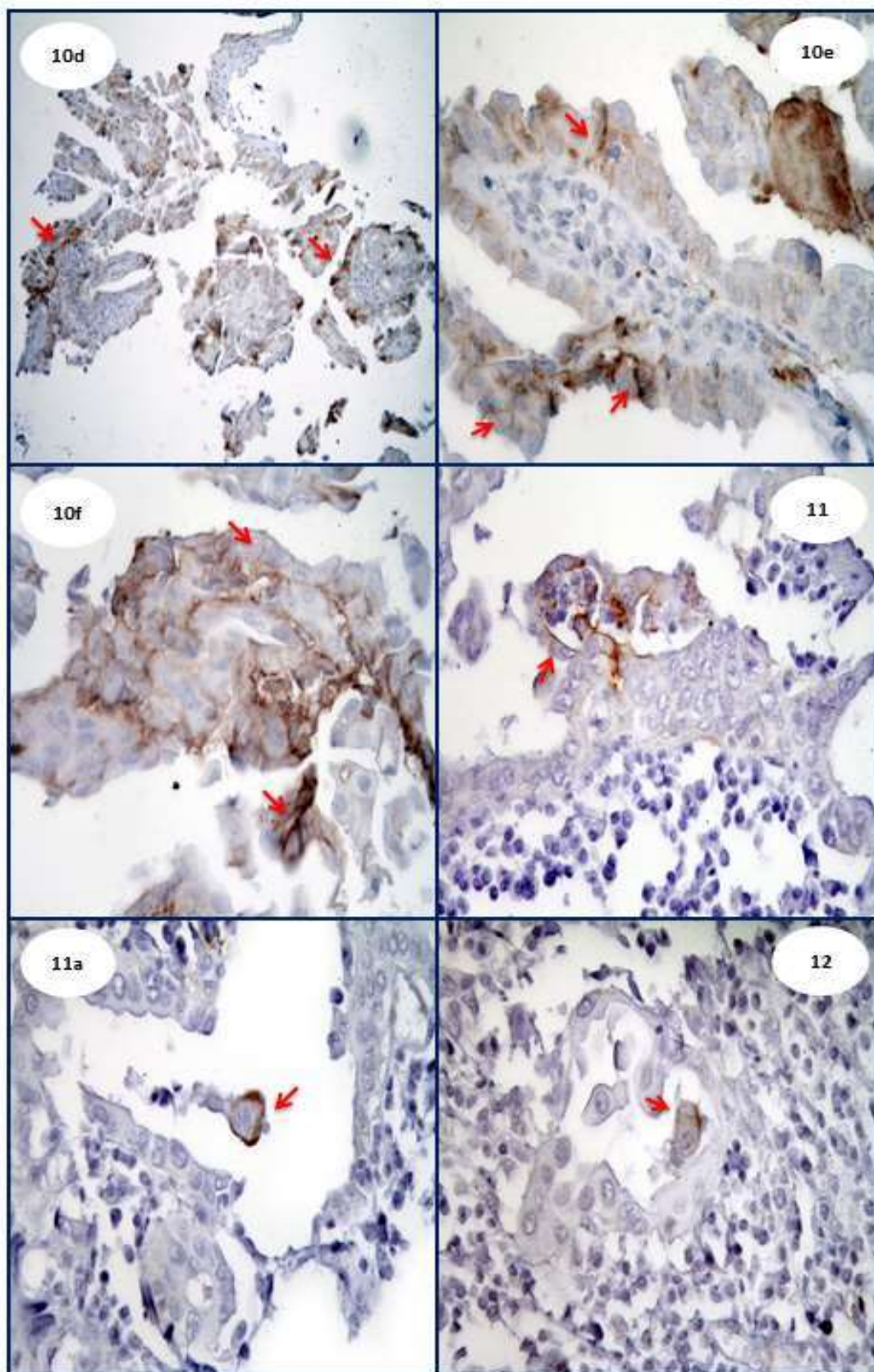
Imágenes del marcador de inmunohistoquímica PD-L1

- 8** Fotomicrografía (40x) del caso número 13. Tinción citoplasmática con intensidad fuerte (flecha)
- 9** Fotomicrografía (10x) del caso número 14. Tinción citoplasmática y membranosa con intensidad fuerte (flechas)
- 10** Caso número 15. El cual fue positivo en 4 de 4 spiral array con patrón de tinción mixto (membranoso y citoplasmático). Tinción membranosa con intensidad fuerte en el 20% y tinción citoplasmática con intensidad moderada en el 20%.

Fotomicrografía (40x) del caso número 15. En el mismo campo se observa tinción membranosa circunferencial incompleta con patrón fuerte y tinción citoplasmática con intensidad moderada (flechas).

- 10a.** Fotomicrografía (40x) del caso número 15. Tinción citoplasmática con intensidad moderada (flecha)
- 10b.** Fotomicrografía (40x) del caso número 15. Tinción citoplasmática y membranosa circunferencial completa con intensidad moderada (flecha)
- 10c.** Fotomicrografía (40x) del caso número 15. Tinción membranosa circunferencial incompleta con intensidad fuerte (flechas)

Expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1



Imágenes del marcador de inmunohistoquímica PD-L1

10d. Fotomicrografía (10x) del caso número 15. Tinción citoplasmática y membranosa con intensidad fuerte (flechas)

10e y f. Fotomicrografías (40x) del caso número 15. Tinción membranosa circunferencial incompleta con intensidad de leve a fuerte (flechas)

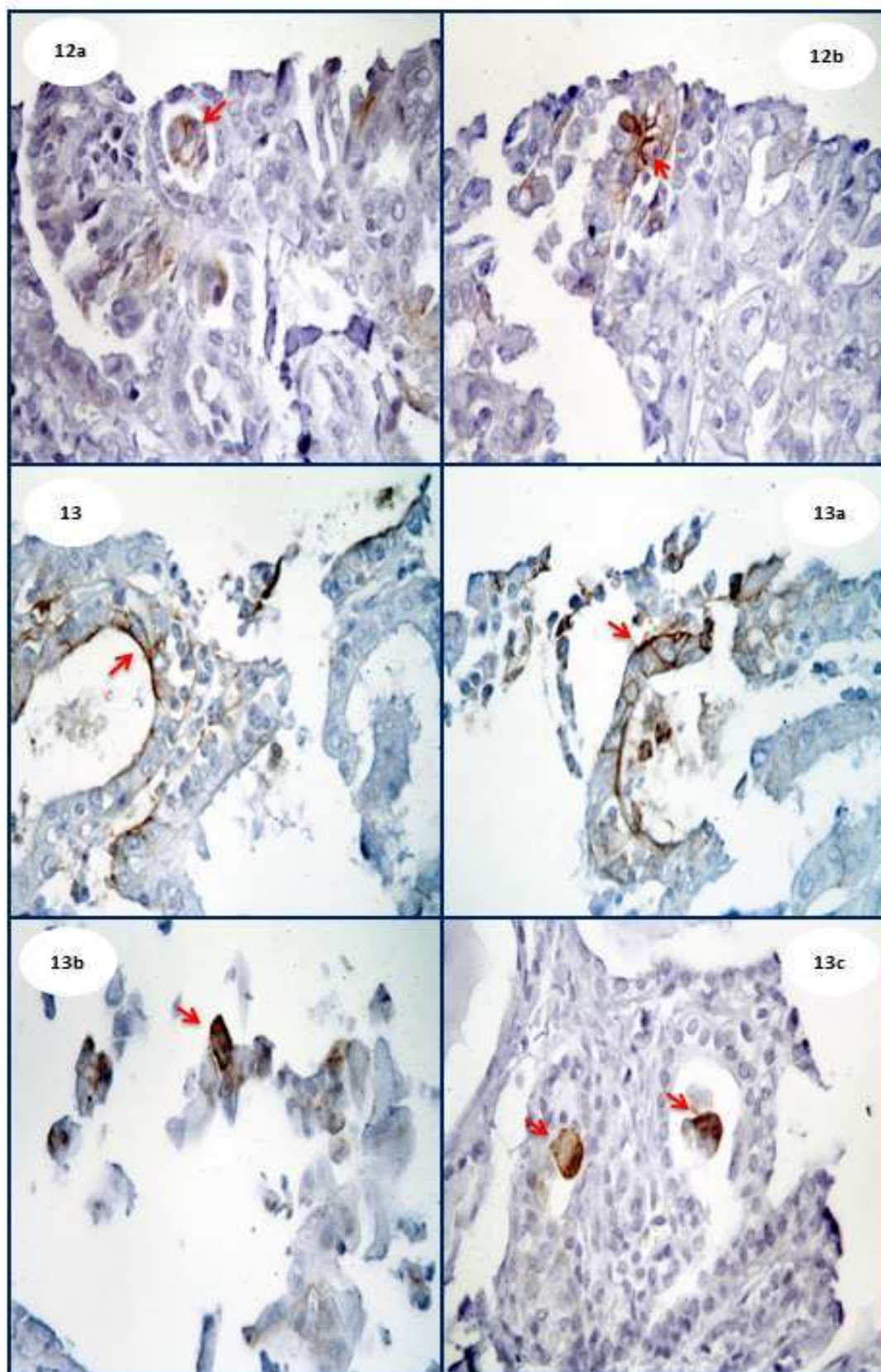
11 . Fotomicrografía (40x) del caso número 18. Tinción membranosa circunferencial incompleta con intensidad fuerte (flecha) .

11a. Fotomicrografía (40x) del caso número 18. Tinción con patrón mixto (membranosa y citoplasmático) circunferencial incompleta con intensidad fuerte (flecha)

12 . Caso número 19. El cual fue positivo en 4 de 4 spiral array con patrón de tinción mixto (membranoso y citoplasmático). Tinción membranosa con intensidad fuerte en el 2% y tinción citoplasmática en el 1%.

Fotomicrografía (40x) del caso número 19. Tinción membranosa circunferencial incompleta con intensidad moderada (flecha).

Expresión del marcador de inmunohistoquímica PD-L1



Imágenes del marcador de inmunohistoquímica PD-L1

12a. Fotomicrografía (40x) del caso número 19. Tinción membranosa circunferencial parcial con intensidad moderada (flecha)

12b. Fotomicrografía (40x) del caso número 19. Tinción citoplasmática y membranosa circunferencial incompleta con intensidad fuerte (flecha)

13 . Caso número 21. El cual fue positivo en 3 de 4 spiral array con patrón de tinción mixto (membranoso y citoplasmático). Tinción membranosa con intensidad fuerte en el 5% y tinción citoplasmática con intensidad moderada en el 2%.

Fotomicrografía (40x) del caso número 21. Tinción membranosa circunferencial incompleta con intensidad fuerte (flecha).

13a. Fotomicrografía (40x) del caso número 21. Tinción membranosa circunferencial completa con intensidad fuerte (flecha)

13b. Fotomicrografía (40x) del caso número 21. Tinción con patrón mixto (citoplasmático y membranoso) circunferencial completo con intensidad fuerte (flecha)

13c. Fotomicrografía (40x) del caso número 21. Tinción citoplasmática con intensidad moderada (flechas)

DISCUSIÓN.

Aunque el campo de la oncología ha tenido gran ayuda gracias a la información que se puede obtener de técnicas auxiliares diagnósticas, como los marcadores de inmunohistoquímica y biología molecular, el problema de identificar los casos de carcinoma papilar de tiroides con comportamiento agresivo sigue siendo un campo de investigación en la patología endocrina. Por lo que son de gran utilidad los parámetros histopatológicos como predictores del comportamiento de la neoplasia, sin embargo sigue existiendo la inquietud de encontrar otras herramientas que puedan ser útiles para identificar los casos que tienen un comportamiento más agresivo.

Nuestro estudio se basa en una nueva técnica histológica llamada —Spiral Arrayll, que consiste en un corte horizontal de tejido con un grosor mayor a los cortes histológico habituales, lo cuales se enrollan y seccionan en subcilindros, de tal forma que se estudia un corte completo del tejido en menos espacio. Por lo que podemos lograr mejorar la representación de áreas múltiples en un tumor y al mismo tiempo mantener las ventajas de micro array convencionales y eliminar el sesgo en la selección del tejido. Además de que las secciones son idénticas a los cortes histológicos habituales con hematoxilina y eosina.

En nuestro estudio incluimos 4 espiral array por caso, en algunos casos no fue posible conservarlos todos por defectos en la técnica histológica por que en algunos casos solo fue posible evaluar 3 spiral array

Encontramos que a mayor número de spiral array había más casos inmunorreactivos, el mayor número de casos se observó con 3 spiral array positivos (40%) y el menor número de casos se observó con 4 spiral array positivos (11.42%), esto debido a la heterogeneidad del marcador de inmunohistoquímica estudiado, PD-L1.

Según lo reportado en la literatura, se ha observado un mayor rango de intensidad en la inmunotinción en tejidos estudiados con técnica de spiral array que en los casos con

técnica de micro array, en uno de dos marcadores de inmunohistoquímica, lo que indica una alta probabilidad de una mejor representación de la heterogeneidad tisular con técnica de spiral array (Fukuoka y colaboradores. 2012)²¹

En un estudio previo donde se evaluó la expresión de PD-L1 mediante la técnica de spiral array en cáncer de pulmón se encontró lo siguiente:

Ellos dividieron cada espiral en 8 segmentos y observaron que el 50% de los segmentos eran negativos en los casos con expresión heterogénea entre el 50 y 76%. Y lo atribuyen al uso de una sola clona (28-8) de PD-L1 (Nakamura y colaboradores. 2017).²²

Evaluamos la expresión de PD-L1 en carcinoma papilar de tiroides con la mutación de BRAF V600e.

En estudio previo de 72 casos de carcinoma papilar de tiroides, 51 fueron clásicos de los cuales en 42 se observó la mutación BRAF, 17 fueron patrón folicular de los cuales en 9 mostraron la mutación BRAF, de otras variedades 2 esclerosantes, 1 de células altas y 2 anaplásicos no mostraron la mutación BRAF.²⁰

En nuestro estudio encontramos que el 80% de los casos estudiados fueron positivos para la expresión de PD-L1 en alguno de los patrones de intensidad estudiados.

Se observó que la mayor parte de los casos (71.42%) se expresó con un patrón mixto, es decir membranoso y citoplasmático, seguido por el patrón membranoso (20%) y en menor porcentaje con un patrón citoplasmático (8.57%). La intensidad que se presentó con mayor frecuencia en los tres patrones fue moderada y la proporción que se mas se observo fue del 1% con diecisiete casos (48.57%).

En cuanto a la sub variante histológica el carcinoma papilar de tiroides clásico fue el que con mayor frecuencia fue positivo para PD-L1 en 25 casos (71.4%).

Se incluyó en nuestro estudio un carcinoma variedad células altas el cual fue negativo. Otros casos de carcinoma de mal pronóstico fueron dos carcinomas anaplasicos originados en un carcinoma papilar de tiroides los cuales fueron positivos para PD-L1,

uno en un patrón membranoso leve en <1% y el otro en un patrón mixto fuerte en el 2%.

En varios estudios previos se habla sobre la expresión de PD-L1 en carcinomas anaplásico, en un uno de ellos se informa que es poco frecuente, la identificación de la expresión de PD-L1 en el carcinoma anaplásico y que la identificación podría tener una relevancia terapéutica directa para los pacientes.

Pero dos estudios previos (Wu et al. 2015, Bastman et al. 2016) informaron la expresión de PD-L1 en los carcinomas anaplásicos de tiroides, y la frecuencia de positividad de PD-L1 fue del 75% y 23%, respectivamente. (Ahn y colaboradores) ²³

En relación al tamaño tumoral, el mayor número de casos positivos para PD-L1 se observó en los mayores de >4 cm con un 45.7% de los casos y solamente esta relación fue estadísticamente significativa ($p=0.008$).

Hasta ahora en lo publicado en la literatura no existe algo sobre la relación de PD-L1 y el tamaño tumoral, (Ahn y colaboradores) ²³ incluyó el tamaño tumoral de los casos con PD-L1 positivo y el rango iba de 0.7 a 5.1 cm.

También se estudió la extensión tumoral y encontramos que el mayor número de casos PD-L1 positivos fueron extratiroideos (68.5%)

Todos los casos tenían mutación V600e del gen BRAF por lo que este parámetro es una constante y no es posible obtener una significancia estadística en relación al estado de PD-L1.

Lo reportado en la literatura en cuanto a la relación de PD-L1 con mutación de BRAF no hubo asociación entre ellas. De 322 casos de carcinoma de tiroides analizados, 187 casos (93.03%) eran negativos para la expresión de PD-L1 y 14 casos (6.96%) eran positivos y de estos, 13 correspondían a carcinoma papilar clásico y uno a carcinoma anaplásico de tiroides, con una significancia estadística de ($p=0.873$). (Ahn y colaboradores) ²³

CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio para evaluar la expresión intratumoral de PD-L1 del carcinoma papilar de tiroides con mutación de V600e del gen BRAF, utilizando la técnica de espiral array.

En nuestro estudio la correlación de la expresión de PD-L1 en Carcinomas Papilares de Tiroides con mutación V600E del gen BRAF mediante la técnica de Espiral Array no fue estadísticamente significativa (35 resultaron positivos para PD-L1 de 44 casos con la mutación BRAF V600E).

De los 44 casos estudiados: 35 fueron positivos para PD-L1 y 9 casos negativos. Se observaron tres patrones de tinción: 1) Mixto (membrana y citoplasma) en el 71.4%, 2) Membranoso en el 20% y 3) Citoplasmático en el 8.5%. El rango de proporción observada fue desde <1 hasta el 20%.

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 y mutación BRAF con la variedad histológica de tumor (p 0.143)

La expresión de PDL-1 correlacionó positivamente con el tamaño tumoral observando mayor positividad en tumores mayores de 4.1 cm (p 0.008). En cuanto a la extensión tumoral intra y extratiroidea no se observó correlación estadísticamente significativa (p 0.464)

De acuerdo a los resultados encontrados en el análisis histológico, inmunohistoquímico y de biología molecular realizados en los casos de carcinoma papilar de tiroides y analizados en este estudio, llegamos a la conclusión de que el tamaño tumoral es el único parámetro estadísticamente significativo (p 0.008) en relación al la positividad de PD-L1.

RESUMEN

ANTECEDENTES: El cáncer de tiroides representa aproximadamente el 1% a 1.5%, de todos los tumores malignos diagnosticados en los Estados Unidos, y su incidencia ha aumentado continuamente en las últimas tres décadas en todo el mundo, esta tendencia está presente en todos los continentes, excepto en África, donde la detección es posiblemente insuficiente.

En cuanto a su clasificación histológica el carcinoma papilar consiste en 85-90% de todos los casos de cáncer de tiroides, seguido de carcinoma folicular (5-10%) y carcinoma medular (alrededor del 2%), carcinoma anaplásico representa menos del 2% de los cánceres de tiroides y suele aparecer en los pacientes de edad avanzada.

La mutación BRAF V600E (mutación BRAF) se ha informado en el 18% a 87% de cánceres de tiroides, incluso hasta en 69% de los carcinomas papilares de tiroides (CPT) y en 20% a 40% de carcinomas anaplásicos de tiroides (CAT). Actualmente, la mutación BRAF se está evaluando como una posible herramienta de escrutinio para la extensión de la cirugía tiroidea y como un posible objetivo terapéutico en CPT.

Se cree que esta mutación desempeña un papel importante en la patogénesis de CPT a través de la activación de la ruta de proteína cinasa, que afecta la regulación transcripcional y la expresión de varios genes que están implicados en la proliferación celular, la supervivencia y la progresión del cáncer. La mutación BRAF también se cree que inhibe el cotransportador de yoduro de sodio, que facilita la captación de yodo y se ha asociado con CPT que son refractarios a la terapia con yodo radiactivo.

La terapia inmunitaria inhibitoria de punto de control parece cada vez más plausible como una posible estrategia de investigación para el tratamiento de los cánceres de tiroides, esto lo sugieren los hallazgos tempranos de estudios realizados.

El receptor de la muerte celular programada 1 (PD-1) y la proteína del ligando muerte programada 1 (PD-L1) están implicados en la capacidad de algunos tumores de evadir o suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales de los pacientes, a través de mecanismos que parecen incluir la supresión de CD8 + Células T. En algunos cánceres, la sobreexpresión PD-L1 se asocia con un mal pronóstico. (2,3)

La inhibición dirigida de la vía de control de inmunidad PD-1 / PD-L1 ha generado gran interés en los últimos años como una estrategia prometedora para tratar el melanoma, el cáncer de pulmón de células no pequeñas y los cánceres renales y colorrectales.

Actualmente, los investigadores están explorando el papel de la vía PD-1 / PD-L1 en el cáncer de tiroides con interesantes resultados tempranos en estudios retrospectivos.

Existen estudios cuyos resultados sugieren que la expresión de PD-L1 en células tumorales y microambiente adyacente se correlaciona con Carcinoma Papilar de tiroides metastásico agresivo y una supervivencia acortada, esto podría justificar la aplicación potencial de inmunoterapia anti PD-1 / PD-L1 para estos pacientes refractarios.

En estudios recientes los pacientes con células tumorales que expresan PD-L1 tuvieron tiempos de supervivencia media significativamente más cortos que aquellos con células tumorales negativas para PD-L1 (60 meses frente a 186 meses, $P = 0,001$), y los niveles más altos de PD-L1 se observaron en los estadios III-IV de CPT, en comparación con los estadios I-IIA y los nódulos benignos de tiroides.

En un estudio realizado en el Hospital de Harvard encontraron que los tumores con la mutación BRAF expresan con mayor frecuencia niveles elevados de inmunosupresor ligando 1 de muerte programada (53% frente a 12,5%) y antígeno leucocitario humano G (41% frente a 12,5%) en comparación con los tumores BRAF wild-type.

Se encontró que los CPT sobre expresan PD-L1 y se encontró con frecuencia en el 53% de los casos, lo que confirma los hallazgos de Cunha et al. Demostrando un aumento de la tinción de PD-L1 en muestras de cáncer de tiroides en comparación con tejido tiroideo benigno.

La expresión de PD-L1 en el cáncer de tiroides se ha asociado con una serie de indicadores de mal pronóstico, prometiéndole anticuerpos antagonistas de la vía PD-1 / PD-L1 actualmente en ensayos clínicos para otros tumores sólidos que deberían considerarse para la inmunoterapia de PTC una vez que estén clínicamente disponibles.

OBJETIVO: Determinar la expresión de PD-L1 en Carcinomas Papilares de Tiroides con mutación V600E del gen BRAF mediante la técnica de Spiral Array. Así como la expresión de PD-L1 en las células epiteliales del carcinoma papilar de tiroides y correlacionar la expresión de PD-L1 con la variedad histológica del tumor, tamaño tumoral y grado de extensión tumoral.

MATERIAL Y METODOS: De una base de datos previamente realizada de los archivos de del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario –Dr. José Eleuterio González, se recabaron los casos de Carcinoma Papilar de tiroides que tuvieran presente la mutación V600E del gen BRAF los cuales se establecieron en el protocolo de tesis –Expresión de los marcadores del ciclo celular Ciclina D1 y P27 y mutación en el gen BRAF en el Carcinoma Papilar intra y extratiroideo (Clave de registro: AP12-002)II

Se contruyeron spiral array de cada uno de los bloques de parafina seleccionados, a los cuales se realizó inmunohistoquímica para PD-L1 (clona 28-8, Abcam).

La detección previa de la mutación de BRAF V600E se utilizó método de PCR en tiempo real.

RESULTADOS: De 44 casos estudiados, 35 fueron positivos para PD-L1 y 9 casos negativos. La mayor parte correspondían a carcinoma papilar clásico (71%). Todos los casos tenían presente la mutación BRAF V600E.

Se observó que a mayor número de spiral array mayor número era la inmunorreactividad para PD-L1. Los patrones de tinción observados fueron membranoso, citoplasmático y mixto, siendo este último el que se presentó en mayor número de casos. En rango de intensidad fue de <1 hasta el 20%.

En cuanto al tamaño tumoral, el mayor número de casos positivos se presentó en el grupo de más 4.1 cm. con 16 casos (45.7%), y en cuanto a la extensión tumoral el mayor número de casos se presentó en los extratiroideos con 24 casos (82.7%).

DISCUSION: En nuestro estudio incluimos 4 spiral array por caso, en algunos casos no fue posible conservarlos todos por defectos en la técnica histológica porque en algunos casos solo fue posible evaluar 3 spiral array

Encontramos que a mayor número de spiral array había más casos inmunorreactivos, el mayor número de casos se observó con 3 spiral array positivos (40%) y el menor número de casos se observó con 4 spiral array positivos (11.42%), esto debido a la heterogeneidad del marcador de inmunohistoquímica estudiado, PD-L1.

En nuestro estudio encontramos que el 80% de los casos estudiados fueron positivos para la expresión de PD-L1 en alguno de los patrones de intensidad estudiados.

Se observó que la mayor parte de los casos (71.42%) se expresó con un patrón mixto, es decir membranoso y citoplasmático, seguido por el patrón membranoso (20%) y en menor porcentaje con un patrón citoplasmático (8.57%). La intensidad que se presentó con mayor frecuencia en los tres patrones fue moderada y la proporción que se más se observó fue del 1% con diecisiete casos (48.57%).

En cuanto a la sub variante histológica el carcinoma papilar de tiroides clásico fue el que con mayor frecuencia fue positivo para PD-L1 en 25 casos (71.4%).

Otros casos de carcinoma de mal pronóstico fueron dos carcinomas anaplasicos originados en un carcinoma papilar de tiroides los cuales fueron positivos para PD-L1, uno en un patrón membranoso leve en <1% y el otro en un patrón mixto fuerte en el 2%.

En relación al tamaño tumoral, el mayor número de casos positivos para PD-L1 se observó en los mayores de >4 cm con un 45.7% de los casos y solamente esta relación fue estadísticamente significativa ($p=0.008$).

También se estudió la extensión tumoral y encontramos que el mayor número de casos PD-L1 positivos fueron extratiroides (68.5%)

Todos los casos tenían mutación V600E del gen BRAF por lo que este parámetro es una constante y no es posible obtener una significancia estadística en relación al estado de PD-L1.

CONCLUSIÓN: En nuestro estudio de los 44 casos estudiados con mutación V600E del gen BRAF: 35 fueron positivos para PD-L1 y 9 casos negativos, sin embargo la correlación de la expresión de PD-L1 en Carcinomas Papilares de Tiroides con mutación V600E del gen BRAF no fue estadísticamente significativa.

En cuanto a los patrones de expresión se observaron tres patrones de tinción: 1) Membranoso 2) Citoplasmático y 3) Mixto (membrana y citoplasma). El rango de proporción de positividad observada fue desde menos de 1% hasta el 20%.

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 y mutación BRAF con la variedad histológica de tumor ($p=0.143$)

La expresión de PD-L1 correlacionó positivamente con el tamaño tumoral observando mayor positividad en tumores mayores de 4.1 cm ($p=0.008$).

En cuanto a la extensión tumoral intra y extratiroidea no se observó correlación estadísticamente significativa ($p=0.464$).

Como aportación en este estudio demostramos la utilidad de la técnica de espiral arrays para estudiar la expresión de PD-L1 ya que como se demostró esta tiende a ser heterogénea y en los cortes espirales a diferentes niveles del tumor se observó positividad unicelular o multicelular aislada y en ninguno de nuestros casos observamos expresión difusa u homogénea en los tumores.

REFERENCIAS

1. Gabriella Pellegriti, Francesco Frasca, Concetto Regalbuto, Sebastiano Squatrito, and Riccardo Vigneri. (2013). Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2013, 1-10
2. Hiroshi Katoh*, Keishi Yamashita, Takumo Enomoto and Masahiko Watanabe. (13 March 2015). Classification and General Considerations of Thyroid Cancer. *Annals of Clinical Pathology*, 3(1): 1045., 2-9
3. Kunjumon DT, Upadhayaya K. Histopathological Features of Papillary Thyroid Carcinoma with special emphasis on the significance of nuclear features in their diagnosis. *Arch Med Health Sci* 2014;2 16-22.
4. Xiao-Min Yu, David F. Schneider, Glen Levenson, Herbert Chen, Rebecca S. Sippel. Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma is a Unique Clinical Entity: A Population-Based Study of 10,740 Cases. *Thyroid*. 2013 Oct; 23(10): 1263–1268.
5. Di Cristofaro J, Marcy M, Vasko V, Sebag F, Fakhry N, Wynford-Thomas D, De Micco. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. *Hum Pathol*, 2006 Jul;37(7):824-30. Epub 2006 May 19.
6. Gonzalez-Gonzalez R, Bologna-Molina R, Carreon-Burciaga RG, Gómezpalacio-Gastelum M, Molina-Frechero N, Salazar-Rodriguez S. Papillary thyroid carcinoma: Differential diagnosis and prognostic values of its different variants: Review of the literature. *ISRN Oncol*. 2011;2011:915925.
7. Sheu SY, Schwertheim S, Worm K, Grabellus F, Schmid KW. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: lack of *BRAF* mutation but occurrence of *RET/PTC* rearrangements. *Modern Pathology*. 2007;20(7):779–78
8. Xiaofei Wang, Wenli Cheng, Chongqing Liu, Jingdong Li Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: Current evidence on clinicopathologic features and molecular biology. *Oncotarget*. 2016 Jun 28; 7(26): 40792–40799. Published online 2016 Mar 20.
9. Abdul Rahman, Wan Faiziah Wan et al. -Solid variant of papillary thyroid carcinoma in a 14-year-old girl. *BMJ case reports* vol. 2013 bcr2013010001. 6 Jun. 2013.
10. Ann E. Walts MDa, Andy Pao BS a , Wendy Sacks MD b , Shikha Bose MDa (2014). BRAF genetic heterogeneity in papillary thyroid carcinoma and its metastasis. *Human Pathology* 45, 935–941
11. Angell, T., Lechner, M., Jang, J., Correa, A., LoPresti, J. and Epstein, A. (2014). BRAFV600E in Papillary Thyroid Carcinoma Is Associated with Increased Programmed Death Ligand 1 Expression and Suppressive Immune Cell Infiltration. *Thyroid*, 24(9), pp.1385-1393.
12. Li, Y., Li, F., Jiang, F., Lv, X., Zhang, R., Lu, A. and Zhang, G. (2016). A Mini-Review for Cancer Immunotherapy: Molecular Understanding of PD-1/PD-L1 Pathway & Translational Blockade of Immune Checkpoints. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), p.1151.

13. Adjei, A. and Hidalgo, M. (2005). Intracellular Signal Transduction Pathway Proteins As Targets for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23(23), pp.5386-5403.
14. Chintakuntlawar, A., Rumilla, K., Smith, C., Jenkins, S., Foote, R. and Kasperbauer, J. (2017). Expression of PD-1 and PD-L1 in Anaplastic Thyroid Cancer Patients Treated With Multimodal Therapy: Results From a Retrospective Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(6), pp.1943-1950.
15. Chowdhury, S., Veyhl, J., Jessa, F., Polyakova, O., Alenzi, A. and MacMillan, C. (2016). Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. *Oncotarget*, 7(22), pp.32318-32328.
16. Fu, G., Polyakova, O., MacMillan, C., Ralhan, R. and Walfish, P. (2017). Programmed Death - Ligand 1 Expression Distinguishes Invasive Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma from Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features. *EBioMedicine*, 18, pp.50-55
17. Shi, R., Qu, N., Luo, T., Xiang, J., Liao, T. and Sun, G. (2017). Programmed Death-Ligand 1 Expression in Papillary Thyroid Cancer and Its Correlation with Clinicopathologic Factors and Recurrence. *Thyroid*, 27(4), pp.537-545.
18. Trevor E. Angell, Melissa G. Lechner, Julie K. Jang, Adrian J. Correa, Jonathan S. LoPresti, and Alan L. Epstein. (2014). *Thyroid*. Volume 24, Number 9, 2014.
19. Dra. Juana Elizabeth Tadeo González, Dra. Oralia Barboza Quintana, Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón (2018). Patología quirúrgica de la glándula tiroides en el hospital universitario «Dr. José Eleuterio González», UANL. Revisión de 20 años
20. Dra. María Victoria González Franco. Dra. Oralia Barboza Quintana .Dr. Luis Ángel Ceceñas Falcón Expresión de los marcadores del ciclo celular Ciclina D1 y P27 y mutación en el gen BRAF en el Carcinoma Papilar intra y extratiroideo (2012).
21. Junya Fukuoka, MD, PhD; Matthias D. Hofer, MD, PhD; Takashi Hori, MS. Spiral Array A New High-Throughput Technology Covers Tissue Heterogeneity. (2012). *Arch Pathol Lab Med*—Vol 136
22. Sayuri Nakamura, Kentaro Hayashi, Yuki Imaoka. Intratumoral heterogeneity of programmed cell death ligand-1 expression is common in lung cancer. (2017). *PLOS ONE*
23. Soomin Ahn, Tae Hyuk Kim, Sun Wook Kim. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. (2017) . *Society for Endocrinology*.